

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Lenka Sedláková**

Vliv kombinované blokády endotelinového a renin-angiotenzinového systému na krevní tlak a  
regresi chronického onemocnění ledvin u modelu angiotenzin II - dependentní formy  
hypertenze

Effect of combined endothelin and renin-angiotensin systems blockade on blood pressure and  
chronic kidney disease regression in model of angiotensin II-dependent hypertension

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MVDr. Libor Kopkan Ph.D.

Praha 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24.4.2017

Podpis

## Poděkování:

Děkuji Prof. Červenkovi za možnost podílet se na řešení výzkumných projektů Centra experimentální medicíny IKEM včetně projektu, který je tématem mé diplomové práce. Děkuji svému školiteli MVDr. Liborovi Kopkanovi Ph.D. za odborné vedení práce, trpělivost, cenné rady a pomoc při vzniku této práce a za jeho podporu v průběhu mého studia. Dále bych ráda poděkovala všem kolegům z oddělení kardio-metabolického výzkumu, kteří mi ochotně pomáhali s experimentální částí této práce.

# Obsah

Obsah.....	4
Abstrakt a klíčová slova .....	7
Abstract and key words .....	8
Seznam zkratk .....	9
Úvod.....	10
Definice chronického onemocnění ledvin .....	11
Klasifikace – přehledná tabulka .....	12
Vyšetření funkce ledvin .....	13
Patofyziologie chronického onemocnění ledvin .....	14
Vztah hypertenze a progrese chronického onemocnění ledvin .....	15
Regulace krevního tlaku a patofyziologie hypertenze .....	17
Renin-angiotenzin-aldosteronový systém .....	19
Biosyntéza a komponenty renin-angiotenzinového systému .....	19
Receptory renin-angiotenzinového systému .....	20
Fyziologie a patofyziologie renin-angiotenzinového systému.....	21
Alternativní vznik angiotenzinu II .....	23
Aldosteron a jeho vliv na progresi chronického onemocnění ledvin a rozvoj hypertenze .....	24
Endotelinový systém .....	26
Biosyntéza a komponenty .....	26
Receptory endotelinového systému.....	27
Fyziologie a patofyziologie endotelinového systému .....	28
Vztah mezi renin-angiotenzin-aldosteronovým a endotelinovým systémem .....	30
Kallikrein – kininový systém .....	31
Plazmatický kallikrein-kininový systém .....	32
Tkáňový kallikrein-kininový systém.....	32
Interakce mezi kallikreni-kininovým a renin-angitenzinovým systémem .....	33
Léčba chronického onemocnění ledvin a hypertenze .....	34
Blokátory renin-angiotenzinového systému .....	34
Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu .....	34
Inhibitory AT <sub>1</sub> receptoru angiotenzinu II.....	35
Přímé inhibitory reninu .....	36
Duální blokáda renin-angiotenzinového systému .....	36
Blokátory endotelinového systému .....	37

Další možnosti léčby .....	37
Blokátory kalciových kanálů.....	37
Diuretika.....	38
Inhibitory aldosteronu .....	38
$\beta$ -blokátory .....	39
Blokátory $I_1$ imidazolinových receptorů a blokátory $\alpha_1$ –adrenergních receptorů.....	39
Standartní postupy léčby hypertenze a chronického onemocnění ledvin.....	40
Cíle diplomové práce .....	41
Experimentální část .....	42
Modelový organismus .....	42
Ren-2-transgenní model hypertenze.....	42
Model 5/6 nefrektomie .....	42
Ligační model 5/6 nefrektomie .....	42
Ablační model 5/6 nefrektomie.....	43
Zdánlivá operace u kontrolních zvířat.....	43
Výběr léčby .....	43
Experimentální skupiny a průběh experimentu.....	43
Podmínky chovu a manipulace se zvířaty .....	45
Laboratorní metody .....	45
Stanovení albuminu v moči.....	45
Stanovení kreatininu v moči a v plazmě .....	46
Plazmatický kreatinin .....	46
Kreatinin v moči.....	47
Stanovení plazmatické reninové aktivity (PRA) .....	47
Stanovení angiotenzinu II v plazmě a v tkáni ledviny .....	48
Stanovení angiotenzinu 1-7 v tkáni ledviny .....	49
Stanovení endotelinu-1 v kůře ledvin.....	50
Expres AT <sub>1</sub> a AT <sub>2</sub> receptoru ve tkáni ledviny .....	51
Histologie a index glomerulosklerózy.....	53
Statistické zpracování výsledků .....	55
Výsledky.....	56
1. série: Porovnání vlivu kombinované léčby inhibice RAS a selektivního ET <sub>A</sub> receptoru se samotnou duální RAS bloádou na přežívání a progresi CKD u 5/6 NX TGR .....	56
2. série: Vliv kombinované léčby na krevní tlak.....	59
3. série: Vliv kombinované léčby na komponenty RAS a ES.....	61

Diskuze.....	65
Význam studie pro klinickou medicínu .....	66
Závěr.....	67
Použitá literatura .....	68
Reference.....	68
Zdroje obrázků .....	78

## Abstrakt a klíčová slova

Nepřiměřená aktivita renin-angiotenzinového systému (RAS) a endotelinového systému (ES) hraje významnou patofyziologickou úlohu v rozvoji hypertenze a progresi chronického onemocnění ledvin (CKD). V této studii bylo cílem ověřit, zda kombinovaná inhibice RAS a selektivní inhibice ET<sub>A</sub> receptoru pro endotelin 1 (ET-1) bude vykazovat aditivní účinky v protekci ledvin u experimentálního modelu CKD. Tento léčebný postup byl testován na transgenních potkanech s myším reninovým genem (TGR), kterým byla provedena ablační nefrektomie (5/6 NX) ve věku 6 týdnů. Za dalších 6 týdnů byla podána příslušná terapie v pitné vodě: duální RAS blokáda (trandolapril 6mg/l + losartan 100mg/l) nebo kombinace duální RAS blokády + ET<sub>A</sub> receptorového inhibitoru (atrasentan 25mg/l). Výsledky první série ukázaly 100 % mortalitu neléčených 5/6 NX TGR do 30. týdne od provedení 5/6 NX. Oba typy léčby shodně zvýšily přežití 5/6 NX TGR na 30 % po 50. týdnu experimentu. V druhé sérii byl monitorován vliv léčebných postupů na krevní tlak (TK) 5/6 NX TGR, u kterých systolický TK dosahuje přes 210 mmHg. Oba léčebné přístupy vedly k poklesu TK, a to až na úroveň normotenzních potkanů a zmírnily srdeční hypertrofii. Ve třetí sérii bylo prokázáno, že léčba výrazně snižuje renální hladiny angiotenzinu II (ANG II) a výrazně zvyšuje koncentrace angiotenzinu 1-7 (ANG 1-7) u 5/6 NX TGR. Nefrektomie vede k velmi významnému zvýšení hladiny ET-1 v ledvinách, které byly signifikantně sníženy oběma léčebnými postupy u 5/6 NX TGR. Naše studie prokázala, že kombinovaný léčebný postup inhibující RAS a selektivně ET<sub>A</sub> receptor pro ET-1 vykazuje stejné organoprotektivní účinky jako samotná duální blokáda RAS ve všech sledovaných parametrech u experimentálního modelu rozvinuté CKD.

Krevní tlak, hypertenze, chronické selhání ledvin, renin-angiotenzinový systém, renin-angiotenzin-aldosteronový systém endotelinový systém, léčba hypertenze, léčba chronického onemocnění ledvin, experimentální model

## Abstract and key words

Enhanced activation of renin-angiotensin system (RAS) and endothelin system (ES) plays the key pathophysiological role in the progression of hypertension and the chronic kidney disease (CKD). The aim of this study was to verify whether the combined inhibition RAS and selective inhibition ET<sub>A</sub> receptor for endothelin 1 (ET-1) will show additive renoprotective effects in experimental model CKD. This therapeutic approach was tested on the transgenic rats with mouse renin gene (TGR), to whom ablation nephrectomy (5/6 NX) was done in the age of 6 weeks. After next 6 weeks the relevant treatment was given in drinking-water: dual RAS blockade (trandolapril 6mg/L + losartan 100mg/L) or the combination of dual RAS blockade + inhibitor of ET<sub>A</sub> receptor (atrasentan 25mg/L). Results of the first series show 100 % mortality in untreated rats with 5/6 NX to the 30<sup>th</sup> week. Both type of treatments increased the survival rate up to 30 % in 5/6 NX TGR after the 50<sup>th</sup> week. In the second series influence of treatments on the blood pressure (BP) was monitored in 5/6 NX TGR, which had systolic BP over 210 mmHg. Both treatments decreased BP to the level normotensive rats and reduced heart hypertrophy. In the third series the results showed that treatment significantly decreased renal level of angiotensin II (ANG II) and significantly increased concentration of angiotensin 1-7 (ANG 1-7) in 5/6 NX TGR. Nephrectomy leads to very significant increase level ET-1 in kidneys, which were significantly decreased with both type of treatments in 5/6 NX TGR. Our study showed that combined treatment inhibiting RAS and selective ET<sub>A</sub> receptor displayed the same organoprotective effects as the dual blockade RAS alone in all monitored parameters in the experimental model of developed CKD.

Blood pressure, hypertension, chronic kidney disease, renin-angiotensin system, renin-angiotensin-aldosterone system, endothelin system, treatment of hypertension, treatment of chronic kidney disease, experimental model



## Seznam zkratek

5/6 NX	ablační model 5/6 nefrektomie
ACE	angiotenzin-konvertující enzym
ACEi	inhibitor angiotenzin-konvertujícího enzymu
ANG	angiotenzin
ARB	blokátor AT <sub>1</sub> receptorů
AT <sub>1/2</sub>	specifický receptor pro angiotenzin
B <sub>1/2</sub>	specifický receptor pro bradykinin
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
CKD	chronické onemocnění ledvin
C <sub>krea</sub>	koncentrace kreatininu
ECE	endotelin-konvertující enzym
ES	endotelinový systém
ET	endotelin
ET <sub>A/B</sub>	specifické receptory pro endotelin
GFR	glomerulární filtrace
IL	interleukin
KKS	kallikrein-kininový systém
MRB	blokátor mineralokortikoidních receptorů
mRNA	messangerová ribonukleová kyselina
NO	oxid dusnatý
OECT	objem extracelulární tekutiny
PG	prostaglandin
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronový systém
RAS	renin-angiotenzinový systém
RBF	průtok krve ledvinou
ROS	volné kyslíkové radikály
S <sub>krea</sub>	sérový kreatinin
TGR	ren-2-transgenní potkan
TK	krvní tlak

# Úvod

Ledviny zastávají v lidském těle velmi důležitou roli hned v několika ohledech: odstraňují z cirkulace metabolické produkty, toxiny a látky tělu cizí, produkují hormony, které se podílejí na erytropoéze a metabolismu vápníku nebo mají své postavení v glukoneogenezi. Další důležitou funkcí ledvin je regulace vodní, elektrolytové a acidobazické rovnováhy, čímž přispívají k dlouhodobé regulaci TK. Tato funkce je výrazně ovlivňována aktivitou řady významných vazoaktivních systémů jako je renin-angiotenzin-aldosteronový (RAAS), endotelinový (ES), kallikrein-kininový systém (KKS) nebo systém oxidu dusnatého (NO).

Fyziologické působení těchto významných vazoaktivních systémů udržuje homeostázu organismu, ať už fungují v určité návaznosti nebo protichůdně. Pokud dojde k vybočení z rovnováhy v daném systému, nebo v jejich vzájemné interakci, má to vážný dopad na funkci orgánů, včetně ledvin, a tím na celý organismus. Mezi takové poruchy lze zařadit rozvoj hypertenze a pokles fyziologické funkce ledvin - ledvinná nedostatečnost, která může vyústit až v selhání ledvin. Tento závažný stav je pak nutné řešit hemodialýzou či transplantací. Hypertenze a ledvinná nedostatečnost spolu velmi úzce souvisí a tvoří tak *circulus vitiosus*, který celkový stav organismu stále zhoršuje, zejména pokud není nasazena účinná farmakologická léčba.

Hypertenze jako taková představuje velmi vážný celosvětový problém. V České republice je odhadována prevalence výskytu u žen na 34% a u mužů téměř v 50% (Cífková et al. 2010). Tento problém je úzce spjat nejen s genetickou predispozicí, ale také s životním stylem, který zahrnuje nevhodné jídlo s vysokým obsahem soli, sedavé zaměstnání a vysokou míru stresu. Proto vedle podání antihypertenziv je rovněž důležitá změna přístupu pacienta k těmto rizikovým faktorům.

Ledvinná nedostatečnost a progrese CKD představuje rovněž vážný problém, což souvisí i často s pozdní diagnostikou až v pokročilém stádiu tohoto onemocnění, kdy je jediným řešením pravidelná hemodialýza, která pacienta velmi limituje a často mu komplikuje soukromý, sociální i pracovní život. Počet pacientů s nemocnými ledvinami je však těžko zjištěitelný právě proto, že mnozí o zhoršené funkci vůbec neví. K roku 2011 bylo v ČR okolo 6000 dialyzovaných a 4000 pacientů po transplantaci ([www.nefrol.cz](http://www.nefrol.cz)).

I přes to, že je dnešní medicína moderní a na vysoké úrovni, farmakologická léčba hypertenze zpomalující rovněž progresi CKD od doby zavedení zejména inhibitorů angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACEi) nezaznamenává už tak zásadní pokrok. A i přes jejich účinnost stále nedosahuje takových výsledků, aby dokázala progresi CKD ještě více

zpomalit, či dokonce úplně zastavit. Proto je velmi důležité se této problematice stále intenzivně věnovat, a zaměřit pozornost na výzkum a vývoj nových terapeutických postupů, které by cíleně zasahovaly do výše zmíněných vazoaktivních systémů, které hrají v patogenezi hypertenze a CKD zásadní roli. Zdá se totiž, že kombinovaná léčba ovlivňující několik systémů zároveň by mohla přinášet aditivní účinky.

Právě proto cílem této práce bylo srovnat již zavedenou léčbu hypertenze a progresu CKD s kombinovanou farmakologickou inhibicí více vazoaktivních systémů, které zásadně ovlivňují patogenezi.

## Definice chronického onemocnění ledvin

CKD je vážný zdravotní stav, který má pro pacienty vážné důsledky nejen ze zdravotního, ale také ze sociálního hlediska. Velkým problémem bývá pozdní diagnostika, protože pokles funkce ledvin dlouho nevykazuje žádné zdravotní obtíže. Epidemiologické studie ukazují, že CKD postihuje až 15% dospělé populace a číslo se stále zvyšuje. Zlepšující se lékařská péče stále nevyvažuje negativa špatného životního stylu a zvyšujícího se výskytu dalších civilizačních problémů jako je obezita a s tím i souvisejících chorob, například diabetes mellitus 2. typu nebo hypertenze (El-Nahas a Bello 2005, Campbell et al. 2002). V tabulce č. 1 uvádím nejčastější rizikové faktory související s progresí CKD.

**Tabulka č. 1 Rizikové faktory související s progresí CKD (Vachek et al. 2012)**

Faktory ovlivnitelné	Faktory neovlivnitelné
Obezita	Rodinná anamnéza
Kouření	Geny
Příjem bílkovin	Pohlaví
Proteinurie	Etnické faktory
Glykemie	Věk
Krevní lipidy	Typ onemocnění ledvin
Hyperurikemie	
Metabolický syndrom	
Anemie	
Hypertenze	

Doporučení ohledně klasifikace CKD bylo publikováno v roce 2002 v KDOQI (Kidney disease outcomes quality initiative) a kvůli mnohým diskuzím došlo k úpravě klasifikace a definice v práci s názvem „*Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Diseases*“ z roku 2012

([www.kdigo.org/clinical\\_practice\\_guidelines/pdf/CKD/KDIGO\\_2012\\_CKD\\_GL.pdf](http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf)),

a ze které jsem stručně novou klasifikaci a postupy vyšetření CKD zpracovala:

„Chronické onemocnění ledvin je definováno jako funkční nebo strukturální abnormalita ledvin, která trvá déle než 3 měsíce a má dopad na zdraví nositele. Kritéria pro CKD (jakékoliv z následujících přítomné déle než 3 měsíce):

1. Přítomnost poškození ledvin nebo
2. Pokles funkce ledvin (pod  $1,0 \text{ ml.s}^{-1} \cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$ )“

Mezi další ukazatele poškození ledvin patří: albuminurie; nález v močovém sedimentu; nález, který ukazuje poruchy tubulů ledvin; histologický nález, nález po vyšetření zobrazovacími metodami a anamnéza transplantace ledvin.

## Klasifikace – přehledná tabulka

**Tabulka č. 2 Nová klasifikace CKD - S klesající hodnotou GFR a stoupající albuminurií stoupá riziko vzniku CKD**

Kategorie	GFR [ml.s <sup>-1</sup> .1,73 m <sup>-2</sup> ]	Albuminurie [mg/24 h]	Albumin/kreatinin [mg/mmol kreatininu]	Proteinurie [mg/24 h]	Bílkovina/kreatinin [mg/mmol kreatininu]
<b>G1*</b>	≥ 1,50				
<b>G2*</b>	1,0 – 1,49				
<b>G3a</b>	0,75 – 0,99				
<b>G3b</b>	0,50 – 0,74				
<b>G4</b>	0,25 – 0,49				
<b>G5</b>	< 0,25				
<b>A1</b>		<30	<3	<150	<15
<b>A2</b>		30 - 300	3 - 30	150 - 500	15 – 50
<b>A3</b>		>300	>30	>500	>50

\* pokud nejsou ledviny poškozeny, pak pokles GFR nesplňuje kritéria CKD

## Vyšetření funkce ledvin

Mezi základní vyšetření patří zjištění hodnoty glomerulární filtrace (GFR). Metody vyšetření jsou složité, a tak se v klinické praxi využívá výpočet GFR z clearance kreatininu ( $c_{\text{krea}}$ ), inulinu a z koncentrace sérového kreatininu ( $S_{\text{krea}}$ ), případně koncentrace sérového cystatinu C. U zdravého člověka je hodnota  $c_{\text{krea}}$  jen lehce vyšší než hodnota GFR, s poklesem GFR se naměřená hodnota kreatininu zvyšuje. Pro odhad GFR lze využít i koncentraci  $S_{\text{krea}}$ , což je ale méně přesné z důvodu ovlivnění extrarenálními faktory, množstvím svalové hmoty nebo příjmem proteinů a aminokyselin ve stravě.  $S_{\text{krea}}$  se dá využít také do rovnice CKD-EPI (viz tabulka č. 3) vytvořené v roce 2009 (převzato z <http://www.klinickalaborator.cz>):

**Tabulka č. 3 Rovnice CKD-EPI**

odhad GF=  $2,4 \cdot (S_{\text{Krea}}/61,9)^{-0,329} \cdot (0,993)^{\text{věk}}$  **pro krea  $\leq 62 \mu\text{mol/l}$  ženy**

odhad GF=  $2,4 \cdot (S_{\text{Krea}}/61,9)^{-1,209} \cdot (0,993)^{\text{věk}}$  **pro krea  $>62 \mu\text{mol/l}$  ženy**

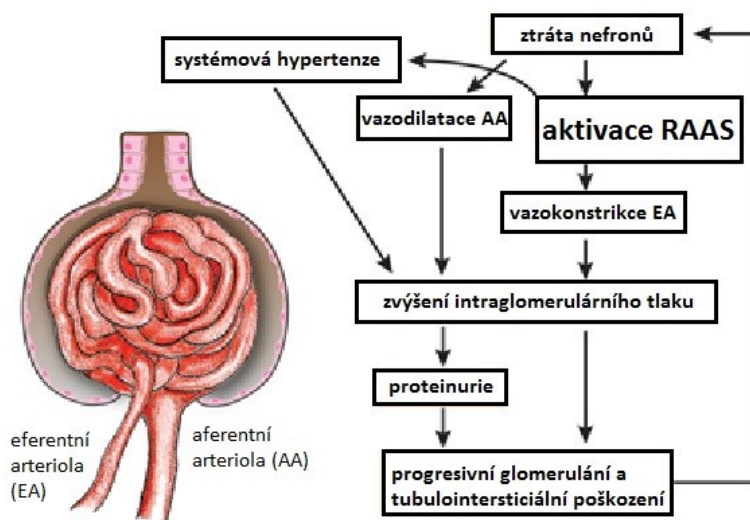
odhad GF=  $2,35 \cdot (S_{\text{Krea}}/79,6)^{-0,411} \cdot (0,993)^{\text{věk}}$  **pro krea  $\leq 80 \mu\text{mol/l}$  muži**

odhad GF=  $2,35 \cdot (S_{\text{Krea}}/79,6)^{-1,209} \cdot (0,993)^{\text{věk}}$  **pro krea  $> 80 \mu\text{mol/l}$  muži**

Dalším základním vyšetřením je stanovení množství bílkovin a albuminu v moči. V poslední době se stanovuje poměr albumin/kreatinin nebo bílkovina/kreatinin. Při zvýšeném vylučování bílkovin mluvíme o proteinurii, kterou můžeme dělit na funkční, prerenální, glomerulární, tubulární, postrenální a arteficiální, případně na malou (ztráta bílkovin  $0,15 - 1,5 \text{ g/24 h}$ ), střední ( $1,5 - 3,5 \text{ g/24 h}$ ) a velkou ( $>3,5 \text{ g/24 h}$ ).

# Patofyziologie chronického onemocnění ledvin

CKD je stav, při kterém klesá funkce ledvin natolik, že dochází ke změnám v objemu extracelulární tekutiny (OECT). Mechanismus rozvoje vychází z poměrně staré teorie, kterou vytvořil Brenner v roce 1982 (Brenner et al. 1982). Tato hemodynamická hyperfiltrační teorie popisuje souvislost mezi redukcí počtu fungujících nefronů a kompenzatorními změnami, jako je například vazodilatace aferentní arterioly a zvýšená perfuze glomerulů, což vede k hyperfiltraci a tím pádem k vzestupu GFR jednotlivých nefronů. Z důvodu hyperfiltrace se udržuje celková GFR na vyšší úrovni, než by odpovídala zbylým funkčním nefronům, což je bráno jako změna adaptivní. V glomerulech dochází ke zvýšení TK, a tím i ke zvýšení permeability (která se projevuje proteinurií), ke vzniku glomerulosklerózy a další redukcii nefronů, což vede selhávající ledviny do terminálního stádia. Tuto teorii potvrdily i další studie s poukázáním na fakt, že významnější roli v progresi hraje přenesení systémového TK do intersticiálních kapilár, čímž dochází k obliteraci a ischemické atrofii tubulů (Fine et al. 1993).



Obrázek 1 Progrese CKD (převzato z <http://todaysveterinarypractice.navc.com>)

*Circulus vitiosus progrese CKD: z důvodu ztráty funkčních nefronů dochází k zvýšené aktivaci RAAS a vazodilataci aferentní arterioly a vazokonstrikci eferentní arterioly, zároveň aktivovaný RAAS přispívá ke vzniku hypertenze. Tyto faktory vedou k vzestupu intraglomerulárního tlaku, ke vzniku proteinurie a k poškození tubulů a glomerulů a v důsledku toho dochází k další ztrátě nefronů.*

Rozvoj CKD lze tedy rozdělit do tří fází: v první fázi dochází k poškození nefronů, ve druhé se spouští opravné mechanismy, které nemusí vést k reparaci, a tím dochází k úbytku

funkčních nefronů. Ve třetí fázi se pak spouští adaptační mechanismy, které ztrátu kompenzují. Tyto mechanismy však mohou fungovat jen určitou dobu (Schnaper et al. 2010).

K poškození v první fázi dochází z důvodu zánětu, vzniku trombu, dysfunkce podocytů nebo cévního poškození v ledvinách. V důsledku dysfunkce podocytů dochází ke vzniku srůstů a adhezi na obnažené cévy v Bowmannově pouzdře. Proteiny se dostávají snáze do periglomerulárního prostoru, což vede ke vzniku zánětu a k fibróze (Eddy a Schnaper 1998; Kriz a LeHir 2005). Dále pak může docházet k poškození tubulů nebo tubulointersticia, dochází ke strukturálním změnám nebo poškození buněk tubulů, čímž se prohlubuje proteinurie (Forbes et al. 2011).

V důsledku poškození nefronů dochází ke kompenzaci zvýšenou činností zbylých zdravých nefronů, k jejich postupnému zvětšování až k hyperfiltraci, s čímž souvisí i aktivace RAAS (Taal a Brenner 2000), který ale zároveň zvyšuje produkci cytokinů způsobujících fibrózu (Eddy 2005). Pokud snaha buněk o opravu poškození není úspěšná, dochází ke zhoršení mikrocirkulace, která je důležitá pro správnou funkci nefronů a životaschopnost buněk (Long et al. 2012). Buňky podléhají apoptóze a dochází ke vzniku fibrózy (Zeisberg et al. 2008). Řada studií poukazuje na souvislost poklesu angiogeneze se zhoršováním renálních funkcí (Choi et al. 2004). Další reakcí, která má důležitou roli při progresi CKD je vznik zánětu tubulointersticia, který navazuje na glomerulosklerotické procesy. Mezi hlavní markery zánětu v tomto případě patří IL-6 a TNF- $\alpha$  (Morel-Maroger Striker a 1984).

## **Vztah hypertenze a progresu chronického onemocnění ledvin**

Podle Světové zdravotnické organizace WHO je za hypertenzi považován systolický tlak nad 140 mmHg a diastolický nad 90 mmHg. Rozdělit ji můžeme na primární a sekundární, kdy většina případů je právě hypertenze primární, u které nemůžeme diagnostikovat mechanismy vzniku. Opakem je hypertenze sekundární se známou příčinou, kterou lze často odstranit. S rozvojem hypertenze navíc úzce souvisí i životní styl, věk (Skrobonja a Kontosic, 1998), užívání různých léků, hormonální antikoncepce a další faktory (Lenfant et al. 2003). Ne vždy je ale antihypertenzní léčba a úprava pacientova životního stylu úspěšná, pak mluvíme o hypertenzi rezistentní. Příčiny vzniku rezistentní hypertenze jsou zmíněné v tabulce č. 4 (Calhoun et al., 2008).

**Tabulka č. 4 Příčiny vzniku rezistentní hypertenze**

Nesprávné měření TK	Objemové přetížení a pseudotolerance	Užívání látek a ostatní	Související stavy
	Nedostatečná diuretická léčba	Lékořice	Obezita
	Onemocnění ledvin	Erytropoetin	Nadměrná konzumace alkoholu
	Nadměrná konzumace sodíku	Cyklosporin a takrolimus	
		Sympatomimetika	
		Kokain, amfetaminy, ...	
		Nesteroidní protizánětlivé léky	
		Nevhodné doplňky stravy	
		Steroidní látky	
		Nízké dávky léčiv	
		Nevhodné kombinace léčiv	

Se vznikem sekundární hypertenze často souvisí parenchymové onemocnění ledvin či další poruchy renálních tepen, jako je vrozené fibromuskulární postižení cévní stěny renálních tepen, projevující se v průběhu života nebo později se projevující stenózy renální tepny na podkladě aterosklerotických změn. S rozvojem dále souvisí poruchy hormonální, změna funkce nadledvin či poruchy centrální nervové soustavy. Přehled hlavních příčin rozvoje sekundární hypertenze jsou v tabulce č. 5 (Calhoun et al. 2008).

**Tabulka č. 5 Příčiny rozvoje sekundární hypertenze**

Příčiny rozvoje sekundární hypertenze
Nemoci ledvin
Renovaskulární poruchy
Poruchy štítné žlázy
Feochromocytom
Cushingův syndrom
Primární aldosteronismus
Koarktace aorty
Spánková apnoe
Některé léky či drogy
Steroidní látky



## Regulace krevního tlaku a patofyziologie hypertenze

Regulaci TK můžeme rozdělit na krátkodobou, střednědobou a dlouhodobou. V krátkodobé regulaci hraje významnou roli aktivace baroreceptorů, chemoreceptorů případně ischemických receptorů pomocí vegetativního autonomního nervového systému – tedy uvolňováním adrenalinu, noradrenalinu či vazopresinu (Mc Carthy et al. 1999).

Střednědobá regulace TK je sice méně přesná a s pomalejším nástupem účinku, ale vykazuje poměrně dobrou stabilitu. Je zajištěna humorálními působky, mezi které patří hormony štítné žlázy, antidiuretický hormon, kortizol, katecholaminy, hormony dřeně nadledvin, eikosanoidy, neuropeptid Y, inzulin a leptin, systémy jako je RAAS, KKS a ES (Souček et al. 2002). Aktivací sympatiku dochází mimo jiné k uvolňování reninu z buněk juxtaglomerulárního aparátu (Steinback et al. 2010), čímž je spuštěna celá kaskáda RAAS.

Dlouhodobá regulace TK souvisí s regulací OECT, hladin sodíku, chloru a birkarbonátu (Guyton et al. 1995). Role ledvin v regulaci TK byla popsána Guytonem roku 1976. Vzestupem TK stoupá výdej tekutin ledvinami, klesá OECT a s poklesem žilního návratu klesá následně i srdeční výdej (Guyton, 1976).

Ledviny a jejich základní funkce, jako je GFR, která závisí na průtoku krve ledvinami (RBF), jsou chráněny před kolísáním systémového TK autoregulačními mechanismy průtoku krve. Zde se uplatňuje myogenní Baylissův mechanismus, kterým je regulován průsvit aferentní a eferentní arterioly (Heller et al. 1993). Dominantně dochází k regulaci na aferentní arteriole (Just a Arendshorst, 2003). Regulace eferentní arterioly je regulována hlavně vazoaktivními látkami (Carmines a Navar 1989). GFR je dále regulováno tubuloglomerulární zpětnou vazbou juxtaglomerulárního aparátu. Vzestupem TK dojde ke zvýšení tlaku v glomerulech, stoupne GFR a množství  $\text{Na}^+$  do macula densa. Macula densa uvolní vazokonstrikční látky, ty zúží aferentní arteriolu a tlak v glomerulech klesne. Tím dochází zároveň k udržení konstantního množství sodíku v distálním tubulu a zároveň i konstantního množství moče (Briggs a Schnermann 1986).

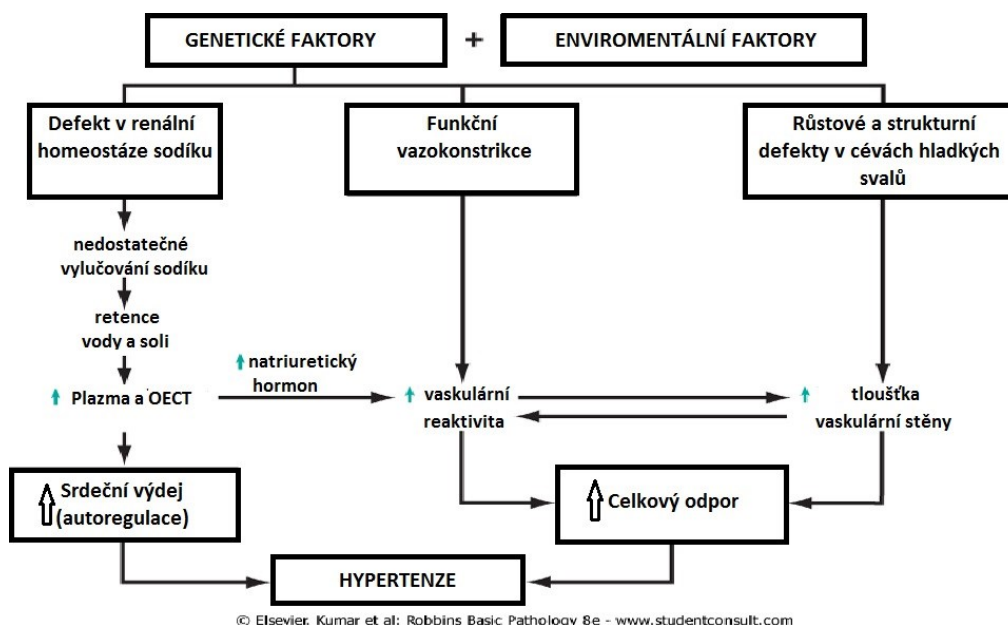
Většina patofyziologických stavů ledvin, kdy dochází k poruchám autoregulace, je popisována u celé řady modelů hypertenze. Vztah mezi vysokým TK a onemocněním ledvin je rovněž velmi úzký, hypertenze způsobí poškození ledvin a urychlí progresi onemocnění, což vede k dalšímu zhoršení hypertenze (Ruggenenti et al. 2000). Ledviny pak nejsou schopné regulovat OECT, s čímž souvisí nadměrná retence sodíku (Navar 1988). V souvislosti se změnami autoregulace dochází ke zvýšené aktivaci RAAS, který zde hraje důležitou roli (Červenka et al. 2000). V tomto případě je důležitý konkrétně intrarenální ANG

II, který vzniká přímo v cévách a tubulech ledvin, a který svým působením na AT<sub>1</sub> receptor způsobuje retenci sodíku a vody (Navar 1988). Důležitou roli v rozvoji hypertenze a progresi CKD hraje také aldosteron, který je stimulován zvýšením ANG II při současné aktivaci adrenokortikotropního hormonu (Mulatero et al. 2004).

Na souvislost mezi hypertenzí a renálním onemocněním poukázal už Richard Bright (Bright 1836) a i další práce dokazují, že v přítomnosti hypertenze dochází k urychlení přechodu mezi jednotlivými stádii CKD (Blantz et al. 1987; Shimamatsu et al. 1985). Naopak snižování TK zpomaluje progresi (Pohl et al. 1974). Hypertenzi jako rizikový faktor v progresi CKD dokazují i novější studie (Bakris et al. 2003).

Klíčovou úlohu při vzniku hypertenze hraje RAAS svými regulačními mechanismy v oblasti rovnováhy sodíku a OECT (Červenka et al. 2000). V případě, kdy začne klesat TK, při stresu, při zvýšené aktivitě baroreceptorů, sympatiku nebo omezením příjmu soli, dochází ke zvýšené produkci reninu signálem z macula densa (Schnermann 2001).

Nejen RAAS, ale i ES má svou klíčovou roli při hypertenzi, což prokázalo mnoho studií (Schiffrin 2001), v patogenezi hrají svou úlohu ET<sub>A</sub> receptory na rozdíl od vazodilatačních natriuretických účinků ET<sub>B</sub> receptorů (Kirkby et al. 2008). Měřením hladin ET-1 ve stěnách cév byla prokázána korelace mezi vzestupem TK a ET-1 (Yokokawa et al. 1991). Tyto systémy a jejich role v důležitých patofyziologických mechanismech rozvoje hypertenze ve vztahu s progresí CKD budou dále rozebírány v následujících kapitolách.



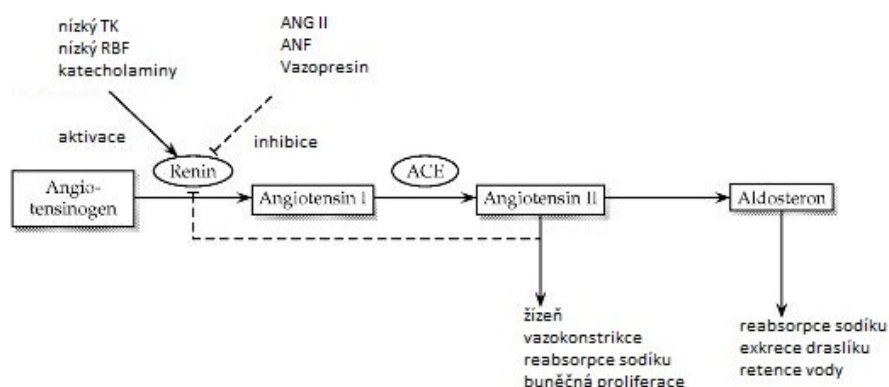
Obrázek 2 Progrese hypertenze (převzato z [www.studentconsult.com](http://www.studentconsult.com))

Genetické a enviromentální faktory vedou ke změnám v homeostáze sodíku, k funkční vazokonstrikci a ke změnám cév hladkých svalů. V důsledku toho se zvyšuje OECT a tím pádem i srdeční výdej, zvyšuje se vaskulární reaktivita a zesiluje se stěna cév, což vede ke zvýšení celkového odporu. Následkem těchto změn je vznik a progrese hypertenze.

# Renin-angiotenzin-aldosteronový systém

RAAS hraje klíčovou roli v regulaci homeostázy, v progresi renálních a kardiovaskulárních onemocnění včetně hypertenze. Nejsilnější účinnou látkou RAAS je ANG II, který působí na specifické receptory (Toke a Meyer 2001). Ve zvýšené míře je aktivován při poklesu příjmu solí a tekutin a s tím souvisejícím poklesem OECT, TK a také při krvácení.

## Biosyntéza a komponenty renin-angiotenzinového systému



Obrázek 3 Hlavní osa kaskády RAAS (převzato z <http://www.urology-textbook.com>)

Působením reninu vzniká z angiotenzinogenu ANG I, který je dále konvertován ACE na ANG II, který působí na uvolňování aldosteronu.

Renin je produkovaný jako preprohormon juxtaglomerulárními buňkami v místě, kde aferentní arterioly vstupují do glomerulů. V endoplazmatickém retikulu juxtaglomerulárních buněk vzniká odštěpením 20-ti aminokyselin prorenin, který je dále skladován v Golgiho aparátu. Pokud dojde k odštěpení dalších 46 aminokyselin, pak vzniká aktivní renin (Carey a Siragy 2003). Část proreninu může být dále uvolňována do cirkulace, kde k aktivaci dochází jen minimálně. Při aktivaci proreninu na renin může hrát roli také plazmatický kallikrein (Campbell 2003). Organismus kontroluje sekreci reninu v ledvinách pomocí intrarenálních baroreceptorů a pomocí množství sodíku v macula densa. Jejich stimulací je renin exocytózou uvolňován z juxtaglomerulárních buněk (Carey a Siragy 2003). K uvolnění reninu dochází při poklesu GFR, stimulací sympatiku, při poklesu příjmu sodíku a poklesu glomerulárního arteriálního tlaku.

Substrátem pro renin je angiotenzinogen, což je glykoprotein, který je primárně syntetizován v játrech, ale zároveň i v srdci, cévách, tukové nebo ledvinné tkáni (Carey a Siragy 2003). Jeho koncentrace v cirkulaci je mnohonásobně vyšší, než je cirkulující

koncentrace angiotenzinu I (ANG I) a ANG II. Nevyužitý angiotenzinogen je vyloučen močí (Lantelme et al. 2002). Pokud je exprese angiotenzinogenu vysoká, zvyšuje se riziko vzniku hypertenze i bez změny koncentrace cirkulujícího ANG II (Sachetelli et al. 2006).

ANG I je dále přeměňován na další metabolity. Nejdůležitější z nich je ANG II, který vzniká odštěpením dvou aminokyselinových zbytků z dekaeptidu ANG I pomocí dipeptidylkaboxypeptidázy angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACE), což je zinková metaloproteáza, která má dvě aktivní C-terminální domény. Právě tyto domény se využívají při inhibici pomocí ACEi. ACE existuje ve formě solubilní a ve formě membránově vázané (Carey a Siragy 2003). Většina ACE ale existuje jako membránově vázaný enzym na různých typech buněk. V ledvinách se dominantně tvoří v proximálním tubulu (Defendini et al. 1983), díky tomu může ANG II z ANG I vznikat přímo lokálně v tkáních (Carey a Siragy 2003). Koncentrace ANG II je mnohem vyšší v intrarenální intersticiální tekutině než v plazmě (Pendergrass et al. 2006). ANG II je velmi rychle (během několika sekund) degradován peptidázami nebo metabolizován angiotenzinázami. Odstraněním jedné aminokyseliny vzniká angiotenzin III (ANG III) a dále pak angiotenzin IV (ANG IV) (Campbell 2003).

Z ANG I i z ANG II může vzniknout účinkem endopeptidáz nebo angiotenzin-konvertujícího enzymu 2 (ACE 2) ANG 1-7, který je pak rozštěpen na další metabolity (Ferario et al. 2005). ANG 1-7 ovlivňuje renální funkce vznikem natriurézy a diurézy, zvyšuje průtok krve v srdečním myokardu a působí proti účinkům ANG II spojeným s hypertrofií, fibrózou a trombózou (Kucharewicz et al. 2002). ANG 1-7 dále stimuluje NO a prostaglandiny a působí tak vazodilatačně (Carey a Siragy 2003).

## **Receptory renin-angiotenzinového systému**

RAS má své specifické receptory, přes které jsou zprostředkovány jeho jednotlivé účinky. Receptor pro renin, který najdeme v srdci, placentě, mozku, plicích, játrech a ledvinách, je tvořený 350-ti aminokyselinami a jednou transmembránovou doménou (Nguyen 2007).

Hlavními receptory RAS však jsou receptory pro ANG II – AT<sub>1</sub> a AT<sub>2</sub>, které se přímo podílejí na regulaci TK (Brown a Sernia 1994). Oba receptory jsou spřažené s G-proteiny. Hlavní účinky ANG II jsou zprostředkovány přes AT<sub>1</sub> receptor, naopak AT<sub>2</sub> receptor působí jako antagonist (Dinh et al. 2001). Na rozdíl od člověka, u myši a potkanů najdeme ještě dvě další formy receptorů – AT<sub>1A</sub> a AT<sub>1B</sub> (Campbell 2003).

AT<sub>1</sub> receptory v ledvinách najdeme v hladké svalovině renálních cév, v proximálním tubulu, v tlustém vzestupném raménku Henleovy kličky, v distálním tubulu, sběracím kanálku, v macula densa i na glomerulárních podocytech (Harrison-Bernard et al. 1997). AT<sub>1</sub> v srdci působí pozitivně inotropně, v mozku aktivují žízeň, pocit chutě na slané, podílí se na regulaci TK, na aktivaci sympatiku a na uvolňování vazopresinu. V játrech stimuluje metabolismus glykogenu a v kůře nadledvin uvolňování aldosteronu a vazokonstrikci cév hladkých svalů (Metha a Griendling 2007; Brown a Sernia 1994).

AT<sub>2</sub> jsou mnohem více exprimovány ve fetálních ledvinách a během neonatálního vývoje dochází ke značnému poklesu, u dospělých jsou syntetizovány v aferentní arteriole, v mesangiálních a endoteliálních glomerulárních buňkách, v proximálním tubulu a v intersticiálních buňkách (Ozono et al. 1997). AT<sub>2</sub> receptory nenajdeme jen v ledvinách, ale také v srdci, mozku, nadledvinách a reprodukční tkáni (Dinh et al. 2001). AT<sub>2</sub> nepůsobí jen vazodilatačně, ale také inhibičně na syntézu reninu (Siragy et al. 2005). Dalo by se říci, že AT<sub>2</sub> mají v organismu ochrannou roli, která je zprostředkována přes NO a bradykinin (Wei CC et al. 2002).

Na oba receptory a zároveň přes ANG III - specifický receptor působí ANG III (Campbell 2003). Na AT<sub>4</sub> receptor, kam patří například inzulinem regulovaná aminopeptidáza, působí ANG IV (Harding et al. 1994). ANG 1-7 působí přes Mas receptory (Ferrario et al. 2005).

### **Fyziologie a patofyziologie renin-angiotenzinového systému**

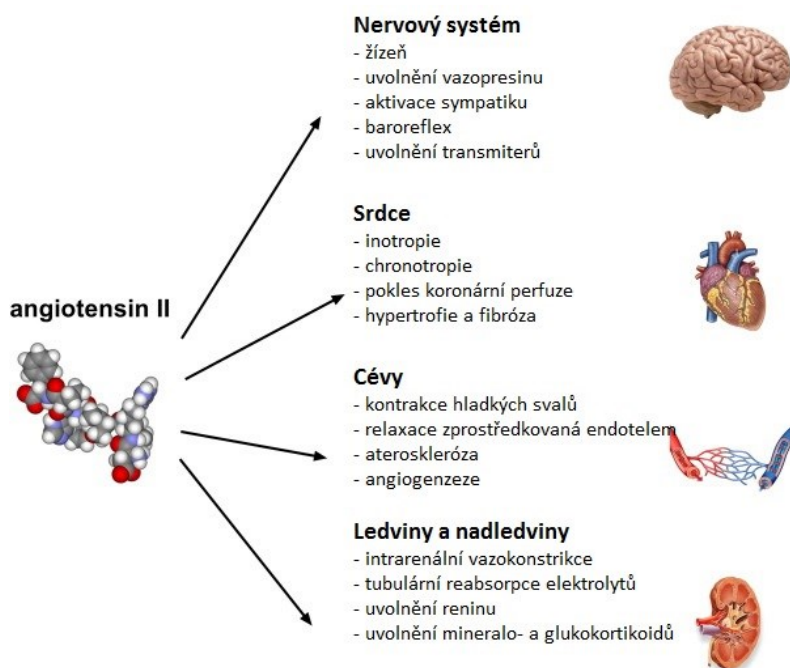
Přímá role reninu je stále zkoumaná, protože je možný jeho podíl v procesech hypertrofie, fibrózy a následné apoptóze buněk, zejména zvyšováním aktivity RAS, který se právě při tkáňovém poškození zvyšuje (Nguyen 2007). Dalším přímým efektem by mohlo být uvolňování aldosteronu a tím i regulace TK (Carey a Siragy 2003).

I přes své vazokonstrikční působení hraje ANG I hlavní roli jako zdroj ANG II, který je hlavním mediátorem tohoto vazoaktivního systému (Carey a Siragy 2003). ANG II působí jako vazokonstriktor, stimulátor uvolňování aldosteronu a katecholaminů, ovlivňuje reabsorpci vody a soli v epitelu střeva a v ledvinách a zároveň působí pozitivně inotropně (Stock et al. 1995).

V ledvinách má ANG II vazokonstrikční účinky jak na eferentní, tak na aferentní arteriolu. Tím, že stimuluje kontrakce mesangiálních buněk, snižuje RBF, GFR a množství filtrovaného sodíku (Granger a Schnackenberg 2000). Dalším efektem je stimulace tubulární

resorpce sodíku a pokles tlakové natriurézy tím, že je zvyšována citlivost tubuloglomerulární zpětné vazby (Mitchell a Navar 1988). ANG II má stimulační účinky na proximální tubulus, na aktivitu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  kotransportu a na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázu. V distálním tubulu reguluje  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  kotransport (Garvin 1991). Kromě toho ANG II působí proliferačně, prozánětlivě a přispívá k fibróze ledvin, čímž ovlivňuje jejich funkci a zvyšuje TK (Navar et al. 2002). S těmito patofyziologickými procesy se zároveň stimuluje uvolňování různých cytokinů a oxidativní stres (Romero a Reckelhoff 1999).

RAS můžeme rozdělit dle jeho lokálního působení na intrarenální, cévní, srdeční a nadledvinový. V cévním RAS je tvořen ANG I i ANG II buňkami endoteliálními, endokardiálními a buňkami hladké svaloviny cév (Dzau 1984, Carey a Siragy 2003). Důležitou roli v cévním RAS hraje endotelium, které vychytává renin z cirkulace, který dále tvoří cévní ANG II (Hilgers et al. 2001).



Obrázek 4 Působení ANG II (převzato z <http://www.sciencedirect.com>)

Intrarenální RAS byl první tkáňový RAS, který byl popsán na základě *in vivo* intrarenální inhibice systému a později důkazem přítomnosti všech komponent RAS v ledvinách (Navar et al. 2002). V ledvinách je renin produkován buňkami proximálního tubulu a buňkami juxtaglomerulárními. Angiotenzinogen najdeme v buňkách kartáčového lemu v proximálním tubulu a dále v lumen tubulů. Zde je štěpen

za vzniku ANG I, který je dál konvertován na ANG II (Carey a Siragy 2003). ANG II stimuluje angiotenzinogen a prorenin pozitivní zpětnou vazbou, a tím dochází k vzestupu koncentrace ANG II během hypertenze (Navar et al., 2002). Distribuce ANG II v dřeni a kůře ledvin není rovnoměrná (Navar et al., 1997) a některé studie naznačují možnost vyššího ovlivnění hemodynamiky v dřeni než v kůře (Navar a Nishiyama 2001), kde je i zároveň vyšší koncentrace receptorů pro ANG II (Omoro et al. 2000).

Myokard obsahuje receptory pro renin, angiotenzinogen, ACE a ANG II (Dostal a Baker 1999). ANG II, který můžeme v srdci nalézt, pochází ze srdečního RAS, z cirkulace vychytáván není (Neri Serneri et al. 1996). Přeměna ANG I na ANG II může být v tomto případě zprostředkována srdeční chymázou místo klasické cesty přes ACE. Srdeční chymáza nedegraduje bradykinin (Urata et al. 1993). Regulace biosyntézy ANG II je zprostředkována glukokortikoidy, thyroïdním hormonem, estrogenem, mechanickým rozpětím ventrikulárních myocytů nebo atriovým natriuretickým peptidem (Carey a Siragy 2003).

V nadledvinovém systému je ANG II hlavním stimulatorem pro sekreci aldosteronu. Pokud je strava chudá na sodík a bohatá na draslík, dochází k vzestupu koncentrace adrenálního reninu, a tím i k vyšší produkci aldosteronu (Carey a Siragy 2003). Dalšími, méně aktivními, metabolity RAS jsou ANG III, ANG IV a ANG 1-7. ANG III se jeví jako stimulator uvolňování vazopresinu v mozku (Reaux 2001). Stejně jako ANG II má vazokonstrikční efekt, ale při inhibici AT<sub>1</sub> receptoru má natriuretický efekt zprostředkovaný AT<sub>2</sub> receptory (Padia et al. 2007). I přes mnohonásobně nižší vazokonstrikční účinky, které má také ANG IV, dochází stimulací jeho AT<sub>4</sub> receptorů k vazodilataci v ledvinách a v mozku, což je pravděpodobně zprostředkované přes NO, který produkuje endoteliální syntáza oxidu dusnatého, kterou ANG IV stimuluje (Harding et al. 1994). U ANG 1-7 obecně platí, že působí proti účinkům ANG II stimulací NO a vazodilatačních prostaglandinů (Carey a Siragy 2003). Jeho nízké koncentrace mohou ovlivňovat renální funkce jak v proximálním, tak v distálním tubulu, a zároveň existuje závislost na rovnováze sodíku a vody, na nervové aktivitě ledvin a aktivaci RAS (Chapell et al. 1998). ANG 1-7 ovlivňuje renální funkce vznikem natriurézy a diurézy tím, že aktivuje transportéry, které se podílí na absorpci vody a elektrolytů v tubulech a sběrných kanálcích. Dále může regulovat tubulární vazopresin (Ferrario et al. 2002), inhibovat oxidativní stres, stimulovat agregaci trombocytů a fungovat jako protizánětlivý činitel. Nedostatečná syntéza či aktivita ANG 1-7 se může také podílet na rozvoji hypertenze (Ferrario et al. 2005).

### **Alternativní vznik angiotenzinu II**

Studie ukazují, že u pacientů léčených ACEi můžeme po určité době léčby zpozorovat zvyšující se hladinu ANG II (Lakkis et al. 2003). Z toho důvodu se začaly hledat další možné alternativní cesty vzniku ANG II bez přítomnosti ACE. První možností je přítomnost chymostatin-senzitivního ANG II tvořícího enzymu, který byl nalezen izolací aorty a konvertuje přeměnu ANG I na ANG II (Okunishi et al. 1987). Další možnou cestou je aktivita

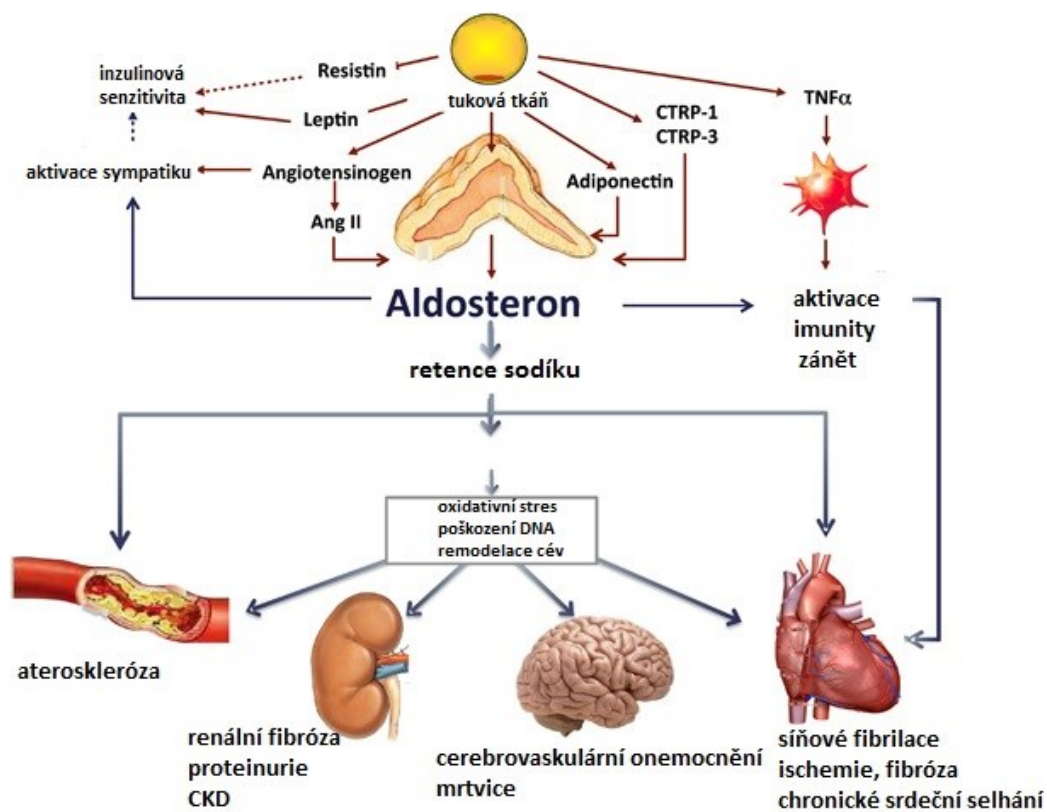
enzymu chymázy, který byl opět nalezen v srdci a je zodpovědný až za 90% vzniku všeho srdečního ANG II (Kinoshita et al. 1991; Urata et al. 1991). Na produkci ANG II se podílí také ACE2, který nepodléhá inhibici ACEi. Bylo prokázáno, že ACE2 konvertuje ANG I na ANG 1-9 (Tipnis et al. 2000) a z ANG 1-9 může dále vznikat zatím neznámým mechanismem ANG II.

## **Aldosteron a jeho vliv na progresi chronického onemocnění ledvin a rozvoj hypertenze**

Aldosteron je mineralokortikoidní hormon uvolňovaný z kůry nadledvin, který se podílí na regulaci homeostázy sodíku a draslíku a je součástí vazoaktivního RAAS. Jeho uvolňování je stimulováno ANG II a je závislé na množství soli přijaté ve stravě (Cairini et al. 1985). Aldosteron působí přes mineralokortikoidní receptory, které najdeme v mnohých neepiteliálních buňkách v těle - v kardiomyocytech (Sato a Funder 1996), v endoteliálních buňkách a buňkách hladkých svalů (Lombes et al. 1992), v mesangiálních buňkách a v podocytech ledvin (Terada et al. 2005; Shibata et al. 2007) a dalších. Aldosteron také stimuluje expresi ET-1, což opět vede k fibróze a k hypertrofii srdce zvýšením množství kolagenu. Bylo prokázáno, že TGF- $\beta$ 1 se významně podílí na těchto procesech (Guarda et al. 1993).

Studie na izolované aferentní a eferentní arteriole ukázala vazokonstrikční vliv aldosteronu nezávisle na mineralokortikoidních receptorech (Arima et al. 2003). Aldosteron se zároveň účastní procesů vedoucích k zánětu a fibróze orgánů, fibróze a remodelaci cév, poškození glomerulů a tubulointersticia ledvin. Tento mechanismus je zprostředkován také zvýšením produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) v mitochondriích různých tkání (Fiebeler et al. 2001) nebo stimulací extracelulárním signálem regulovanou kinázou (ERK), která stimuluje syntézu kolagenu, a tím podporuje fibrózu v ledvinách (Nishiyama et al. 2005).





Obrázek 5 Působení aldosteronu (převzato z <http://www.nature.com>)

# Endotelinový systém

ES patří mezi další důležitý vazoaktivní systém, který se podílí na regulaci TK a homeostázy. Nicméně velmi významnou roli sehrává také v patogenezi celé řady onemocnění jako akutní selhání ledvin a v progresi CKD. Svou roli má i v patogenezi hypertenze a dalších kardiovaskulárních chorob.

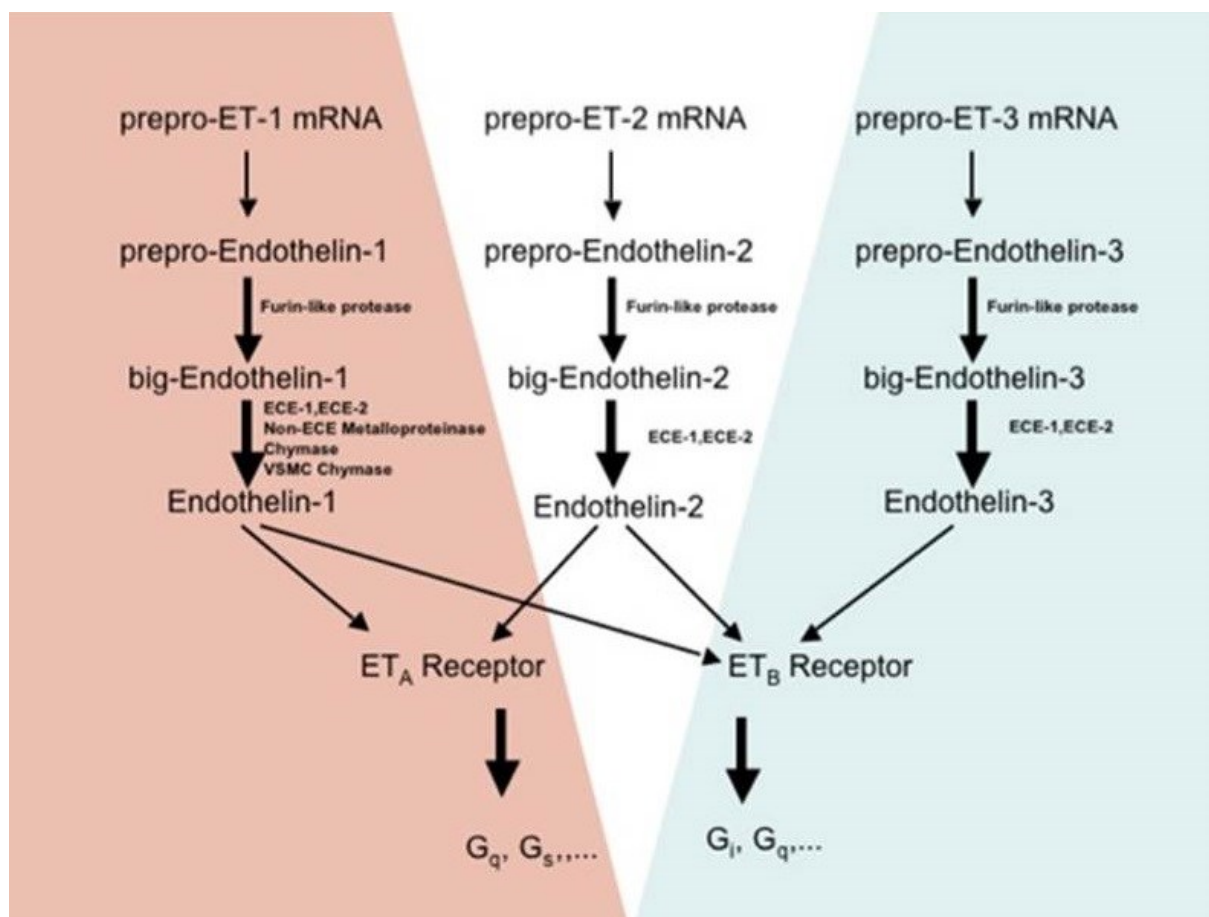
## Biosyntéza a komponenty

Exprese mRNA pro endotelin je regulována různými faktory mezi které patří například ANG II, hypoxie či cytokiny (Maemura et al. 1992). Byly popsány tři izoformy endotelinů - ET-1, ET-2 a ET-3, z čehož je hlavním produktem ET-1 (Yanagisawa et al., 1988).

ET-1 vzniká z preproendotelinu 1, který je dále štěpen na big-ET-1 působením endopeptidázy a má fyziologické účinky, které jsou oproti ET-1 mnohem slabší (Beara-Lasic et al. 1997). Z big-ET-1 hydrolýzou za účasti endotelin konvertujícího enzymu (ECE) vzniká ET-1, který je složen z 21 aminokyselin (D'Orleans-Juste 2003). ECE patří do rodiny metaloproteáz a má 3 formy – ECE 1, ECE 2 a ECE 3, které se liší optimální oblastní pH (Emoto a Yanagisawa 1995). ECE neštěpí jen endotelin, ale také například bradykinin (Luscher a Barton 2000). K degradaci ET-1 dochází několika mechanismy a to neutrální endopeptidázou (Abassi et al. 1992) nebo ET-1 lysozomální karboxypeptidázou (Seyrantepe et al. 2008).

## Receptory endotelinového systému

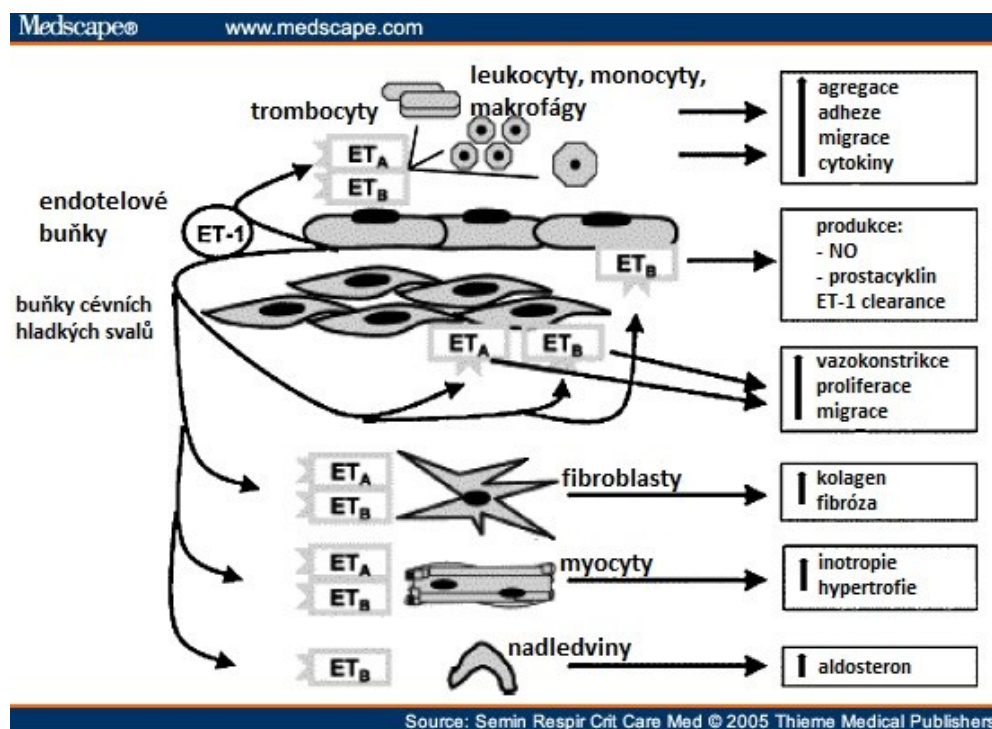
Receptory pro endotelin patří, stejně jako receptory pro ANG II, do rodiny spřažených s G-proteiny (Kedzierski a Yanagisawa 2001) a existují dva typy – ET<sub>A</sub> a ET<sub>B</sub>. ET<sub>A</sub> receptor má nejvyšší afinitu pro ET-1 (Masaki 2000). mRNA pro ET<sub>A</sub> je nejvíce exprimována v aortě a endoteliálních buňkách (Hosoda et al. 1992), dále skoro ve všech fyziologických systémech jako je dýchací, imunitní, kardiovaskulární, nervový, gastrointestinální, endokrinní a urogenitální (Watts 2010). Nejvyšší exprese mRNA pro ET<sub>B</sub> receptor je mozkové kůře a mozečku, plicích, nadledvinách, ledvinách, placentě a tlustém střevu (Ogawa et al. 1991). ET<sub>A</sub> receptory jsou schopné recyklace, která pomáhá jejich dlouhodobé aktivaci (Paasche et al. 2001), na rozdíl od ET<sub>B</sub> receptorů, které podléhají degradaci v lysozomech (Chun et al. 1995).



Obrázek 6 Endotelinový systém (převzato z [www.endothelins.com](http://www.endothelins.com) – Can J Physiol Pharmacol 2008)  
Z preproendotelinu vzniká big-ET, ze kterého působením chymázy nebo ECE vzniká ET.

## Fyziologie a patofyziologie endotelinového systému

ET-1 se řadí mezi silné vazokonstriktory, jeho vazokonstriční potenciál je asi 10x silnější než má ANG II (Yanagisawa et al. 1998). Je produkován zejména buňkami endoteliálními, ale také epiteliálními buňkami, hepatocyty, astrocyty, neurony a buňkami hladkých svalů cév. ET-2 je produkován ledvinnými epiteliálními buňkami a gastrointestinálním traktem, ET-3 neurony, gliovými buňkami, buňkami nadledvin, ledvinnými epiteliálními buňkami a také gastrointestinálním traktem (Attina et al. 2005). ET-1 působí jako stimulator tvorby kolagenu a přispívá k fibrotizaci tkání, což může mít patofyziologické účinky. Dále aktivuje transkripční faktor NF- $\kappa$ B a tím i produkci IL-6, což vede ke vzniku zánětu (Browatzki et al. 2000) a také ovlivňuje kontraktilitu myokardu (Dulce et al. 2006) a mnohé další.



Obrázek 7 Působení endotelinového systému (převzato z <http://img.medscape.com>) ET-1 působují přes své receptory na nadledviny, monocyty, fibroblasty a trombocyty, které dále způsobí například vzestup koncentrace cytokinů, zvýšenou proliferaci a vazokonstrikci, zvyšují produkci aldosteronu či působí pozitivně inotropně.

ET-1 přes ET<sub>A</sub> receptory působí mimo jiné jako stimulátor kontrakce myofibroblastů (Shi-Wen et al. 2004), buněčné proliferace (Kohan et al. 2011) nebo produkce kolagenu (Boyd et al. 2011). Jeho hlavním účinkem ale je vazokonstrikce, která je stimulovaná vzestupem koncentrace vápenatých iontů v buňkách hladkých svalů cév a aktivací protein kinázy C (Saita et al. 1997). ET-1 také hraje svou roli v angiogenezi a procesu vaskulární remodelace (Anggrahini et al. 2009). Jeho nejvyšší koncentrace je v dření ledvin (Kitamura et al. 1989), ve sběrných kanálcích má důležitou roli v regulaci TK a exkrece vody a sodíku. ET-1 v ledvinách hraje roli v regulaci RBF, homeostázy v glomerulech a acidobazické rovnováhy (Wesson 2001). Exogenním ET-1 klesá RBF a koncentrace sodíku ve sběrném kanálku (Tomita et al. 1993). ET-1 i ET-3 působí pozitivně inotropně díky stimulaci atriálního natriuretického peptidu (Munger et al. 1991), což je spíše účinek působení ET<sub>A</sub> receptoru, ET<sub>B</sub> může mít účinek opačný (Piuhola et al. 2003). ET-1 také působí negativně na stěnu cév, kde vyvolává zánětlivé reakce a zvyšuje oxidativní stres, což má za následek remodelaci a endotelovou dysfunkci (Schiffrin 2005).

Naopak vazbou na ET<sub>B</sub> receptor dochází k vazodilataci prostřednictvím produkce NO a prostacyklinů (Kirchengast a Munter 1998). ET<sub>B</sub> receptory mají schopnost ochranné role proti zvýšení koncentrace ET-1 tím, že ho inaktivují (Boyd et al. 2011) a dále se účastní při hospodaření s vodou a solí a tím pádem i při regulaci TK (Hoffman et al. 2000).

Účinky obou receptorů viz tabulka č. 6.

**Tabulka č. 6 Účinky endotelinových receptorů (Brunner et al. 2006):**

ET <sub>A</sub>	ET <sub>B</sub>
Angiogeneze	Antifibrotické účinky
Arytmogeneze	Clearance ET-1
Městnavé srdeční selhání	Fetální/postnatální růst
Mitogeneze	Hojení ran
Restenóza	Myokardiální stabilizace
Vazokonstrikce/hypertenze	Regulace fetoplacentární perfúze
Zánět	Regulace uvolňování Na <sup>+</sup> a vody
	Stabilizace srdečního rytmu
	Vazodilatace

## **Vztah mezi renin-angiotenzin-aldosteronovým a endotelinovým systémem**

Oba systémy samotné mají silnou vazomotorní aktivitu a účastní se v mnoha patofyziologických procesech včetně vzniku hypertenze a v progresi CKD. Zároveň ale spolu interagují, a tím přispívají k dalším možným patofyziologickým procesům. Díky tomu jsou tak zájmem výzkumů v možných nových terapeutických postupech při kombinované inhibici.

Studie vedená skupinou Banes-Berceli z roku 2007 prokázala, že ANG II stimuluje expresi mRNA pro preproET přes  $AT_1$  receptor, zvyšuje uvolňování ET-1 z buněk endotelu, hladké svaloviny a mesangiálních buněk (Banes-Berceli et al. 2007). Naopak ET-1 inhibuje produkci reninu z juxtaglomerulárních buněk, což některé studie dávají do souvislosti s hypertenzí, která vzniká v těhotenství (Polonia et al. 1993). Dále bylo zjištěno, že ET-1 přímo stimuluje produkci aldosteronu (Rossi et al. 1994). ANG II, ET-1 i ET-3 se spolupodílí jako prohypertenzní faktory a účastní se procesů vedoucích k hypertrofii levé srdeční komory a k remodelaci cév (Ito et al. 1993).

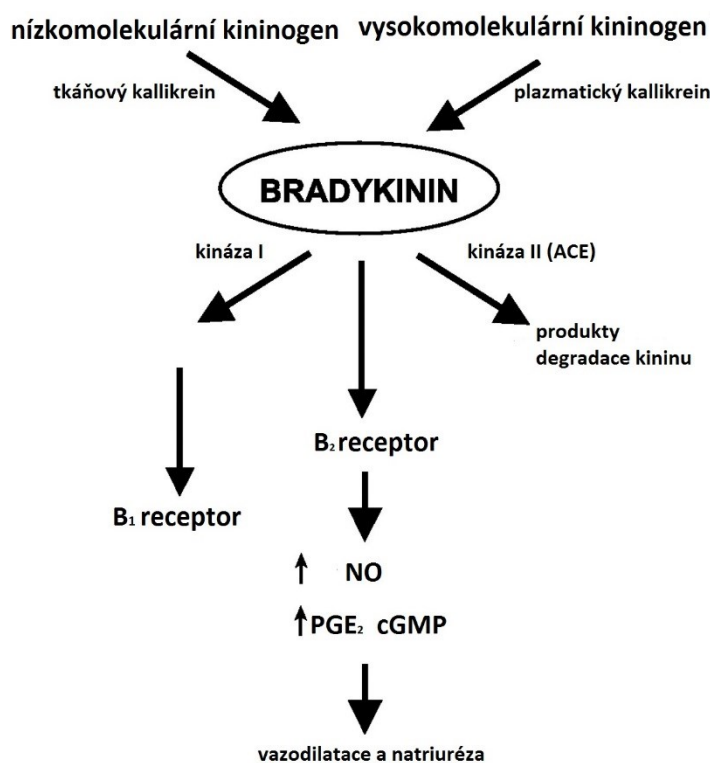
## Kallikrein – kininový systém

KKS patří na rozdíl od vazokonstričních RAAS a ES mezi vazodilatační systémy a brání tak systémové vazokonstrikci, která je způsobená právě nadměrnou aktivací RAAS, ES a sympatického nervového systému. Z toho vyplývá, že hraje určitou roli i v regulaci TK.

Substrátem tohoto multienzymového systému je kininogen, který aktivuje enzym kallikrein a další aktivní metabolity za vzniku bradykininu. Kininogen je u lidí kódován jedním genem, ze kterého alternativním sestřihem vznikají dva typy kininogenu – plazmatický a tkáňový (Bhoola et al. 1992), jindy také označovaný jako vysoko- a nízkomolekulový (Jacobsen 1966).

Kininů jsou oligopeptidy, které mají nejvyšší koncentraci v ledvinách, srdci a aortě a obsahují sekvenci pro bradykinin. Jejich koncentrace je nízká a působí jako místní hormony. Velmi rychle jsou hydrolyzovány kininázami (Campbell et al. 1993). Kininázy jsou peptidázy - nejznámější kininázou je ACE, která zároveň konvertuje přeměnu ANG I na ANG II nebo inaktivuje substanci P (Erdős 1968).

Kininů hrají v ledvinách za fyziologických podmínek však pouze minoritní roli v regulaci RBF. Ale při poklesu příjmu sodíku, při snížené produkci mineralokortikoidů a při



inhibici degradace kininů je KKS aktivován a v regulaci RBF pomáhá významněji (Tomiya et al. 1990). Na úlohu kininů v regulaci GFR při poklesu perfuzního tlaku v ledvině poukazuje studie Tornel J (Tornel et al. 2000).

Bradykinin má dva receptory – B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> (Regoli 1983), které patří do rodiny G-proteinů (McEachern et al 1991). Oba receptory se účastní zánětu, B<sub>2</sub> v akutním (Sharma a Wirth 1996), B<sub>1</sub> v chronickém (Farmer 1997). B<sub>2</sub> receptory se dále účastní na maturaci dendritických

Obrázek 8 Působení bradykininu (převzato z <http://physrev.physiology.org>)

buněk, uvolňování IL-12 a tím pádem na aktivaci obou typů imunitní odpovědi - vrozené i adaptivní (Aliberti et al. 2003). Některé práce také ukazují kardio- a renoprotektivitu (Carretero a Scicli 1978).

## **Plazmatický kallikrein-kininový systém**

Plazmatický kallikrein je také někdy známý jako Fletcherův faktor a je exprimován hlavně v játrech. V plazmě ho najdeme ve formě zymogenu prekallikreinu. Od tkáňového kallikreinu se liší biochemicky, funkčně i imunologicky. Bradykinin vzniká preferenčně z vysokomolekulového kininogenu, kterému se také říká Fitzgeraldův faktor. Plazmatický kallikrein se může společně Fitzgeraldovým faktorem a faktorem XII účastnit koagulace, fibrinolýzy a aktivace komplementu (Aliberti et al. 2003).

Plazmatický kallikrein v endoteliálních buňkách aktivuje prolylkarboxypeptidáza (Ody et al. 1978), která konvertuje prekallikrein na kallikrein ve chvíli, kdy se na membránu buněk naváže vysokomolekulový kininogen a plazmatický prekallikrein (Shariat-Madar et al. 2004). Během zánětu stoupá díky plazmatickému KKS vaskulární permeabilita, která vede ke vzniku edému, k poklesu TK a možnému vzniku sepse (Lewis 1964).

## **Tkáňový kallikrein-kininový systém**

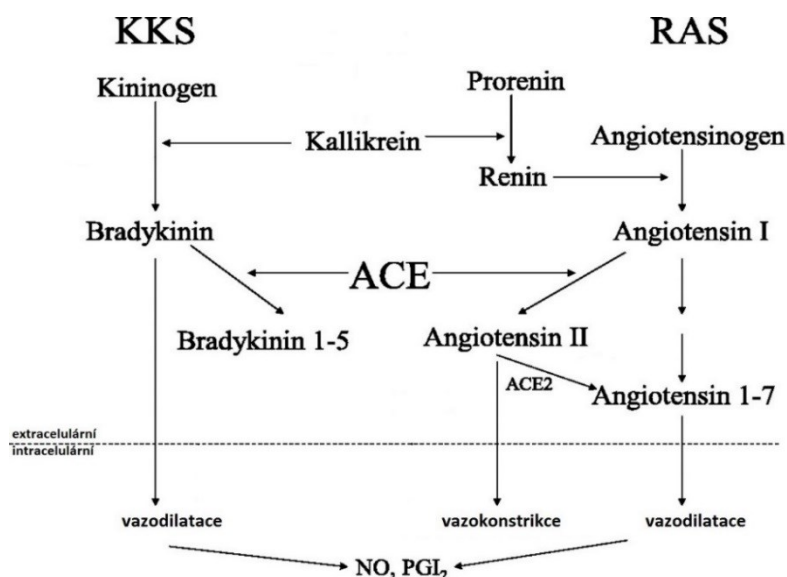
Tkáňový kallikrein je exprimován jedním genem hlavně v ledvinách, v distálním tubulu, což umožňuje lokální, extracelulární produkci bradykininu do moči nebo do krve. Přítomnost bradykininu v moči je dána pouze jeho intrarenální tvorbou, protože ani kininogen ani kallikrein nejsou filtrovány v glomerulu (Nolly et al. 1993). Kallikrein a jemu podobné enzymy však byly nalezeny například i v srdci (Nolly et al. 1994), mozku (Chao et al. 1987) nebo krevních buňkách (Nolly et al. 1993). Ve tkáňovém KKS vzniká bradykinin preferenčně z nízkomolekulového kininogenu. U lidí se uvolňuje bradykinin ve formě lys-bradykininu, kterému se říká kallidin (Alhenc-Gelas et al. 1981).

Tkáňový KKS hraje důležitou roli v regulaci perfuze v ledvinách a myokardu, zvyšuje produkci vazodilatačních mediátorů jako je prostacyklin, NO nebo cGMP. KKS působí více na aferentní než na eferentní arteriolu a tak dochází k vzestupu GFR. Působením bradykininu stoupá RBF v interakci s ANG II (Tsutsumi et al. 1999).



# Interakce mezi kallikreni-kininovým a renin-angiotenzinovým systémem

Jeden z prvních záznamů o interakci mezi RAS a KKS ukázal, že RAS stimuluje renální uvolňování bradykininu prostřednictvím  $AT_2$  receptoru ANG II (Siragy et al. 1996).



Obrázek 9 Interakce RAS a KKS (převzato z <https://www.jci.org>)

Prvním místem interakce obou systémů je přeměna proreninu na renin a kininogenu na bradykinin, kdy jsou obě tyto reakce ovlivňovány působením kallikreinu. Druhým působkem je ACE, který konvertuje bradykinin na bradykinin 1-5 a zároveň ANG I na ANG II. Oba systémy (v případě RAS je to působení ANG 1-7) vedou k vazodilataci a uvolňování NO a prostaglandinu  $I_2$ .

Jak plazmatický, tak tkáňový KKS přispívají k přeměně proreninu na renin (Sealey et al. 1978). Další interakcí mezi těmito dvěma vazoaktivními systémy je ACE, který na jedné straně mění ANG I na ANG II a na straně druhé degraduje bradykinin (Yang et al. 1971). Některé studie také ukazují souvislost mezi bradykininem a ANG 1-7, kdy ANG 1-7 zvyšuje vaskulární aktivitu bradykininu, jeho vazodilatační a hypotenzní efekt (Santos et al. 2001). Pokles TK způsobený aktivitou ANG 1-7 je zprostředkován  $B_2$  receptory bradykininu (Abbas et al. 1997).

# Léčba chronického onemocnění ledvin a hypertenze

## Blokátory renin-angiotenzinového systému

Blokátory RAS lze zařadit v současnosti k často využívaným a dále vyvíjeným prostředkům v léčbě hypertenze, CKD a srdeční nedostatečnosti. Kaskádu můžeme blokovat na různých úrovních – na úrovni reninu, na úrovni ACE a úrovni blokády AT<sub>1</sub> receptorů ANG II. A protože je známo, že ANG II vzniká i alternativní cestou, než jen působením ACE, využívá se často duální léčba, kombinovaná z ACEi a blokátorů AT<sub>1</sub> receptorů ANG II (ARB).

### Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu

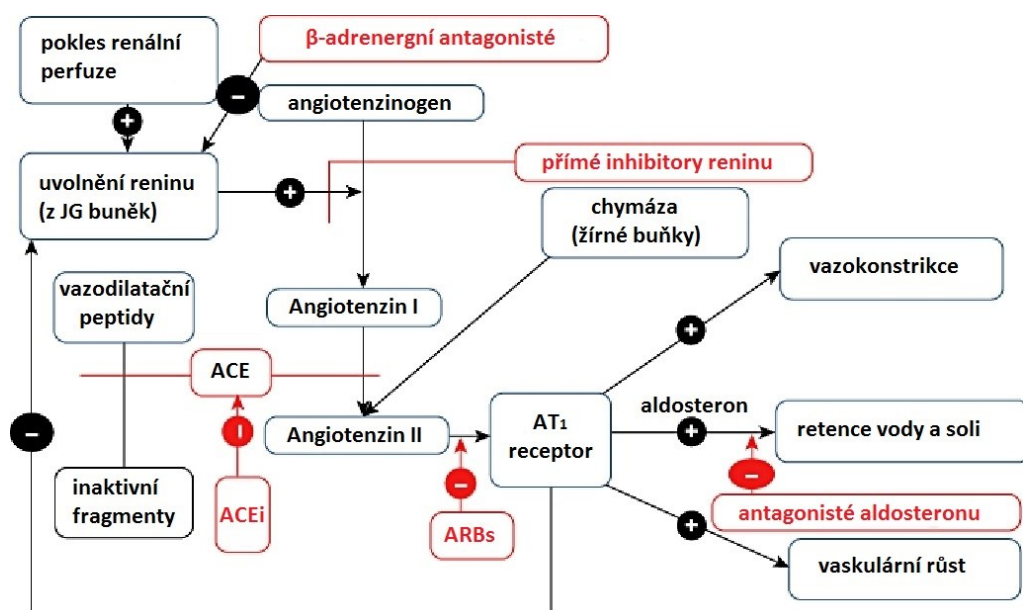
Jak už bylo zmíněno, ACE přeměňuje dekaeptid ANG I na oktapeptid ANG II, který je hlavním produktem RAAS. Inhibicí přeměny se rovněž aktivuje KKS, který působí antagonisticky proti vazokonstrikčním účinkům RAAS. V současné době patří ACEi k základním standardům terapie řady kardiovaskulárních a renálních onemocnění včetně hypertenze a CKD.

Většina ACEi se vyskytuje ve formě proléčiva a působit začnou až po esterifikaci v játrech. Můžeme je rozdělit do tří skupin dle chemické struktury ligandu, který se na ACE váže:

- Sulfhydrylová skupina (kaptopril)
- Karboxylová skupina (cilazapril, enalapril, imidapril, lisinopril, moexipril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, trandolapril)
- Fosforylová skupina (fosinopril) (<http://www.remedia.cz>)

ACEi způsobují snížení koncentrace aldosteronu a vazopresinu a tlumí činnost sympatiku. Na začátku léčby hladina ANG II klesá a po delší léčbě se opět zvedá, což je zapříčiněno již zmíněnou alternativní cestou jeho vzniku. S poklesem hladiny ANG II dochází k redukci srdečního preloadu a afterloadu a k poklesu celkového odporu periferního řečiště. ACEi působí na renální hemodynamiku zábranou přechodu mikroalbuminurie do proteinurie, snižují proteinurii u pacientů s rozvinutou glomerulární dysfunkcí a zpomalují progresi CKD. ACEi pravděpodobně zvyšují hladiny bradykininu, což zvyšuje uvolňování NO a vazoaktivních prostaglandinů, včetně prostacyklinu a prostaglandinu E<sub>2</sub>, což by mohlo přispívat k vazodilatačním, antitrombotickým a antiproliferačním účinkům.

ACEi mají také kardioprotektivní účinky, zvyšují srdeční výdej a podporují endoteliální funkci u pacientů se srdečním selháním (Lopez-Sendon et al. 2004), u pacientů s hypertenzí účinně brání rozvoji hypertrofie (Klingbeil et al. 2003).



Obrázek 10 Blokátory RAAS (převzato z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3045541/>)

### Inhibitory AT<sub>1</sub> receptoru angiotenzinu II

Jak je výše napsáno, AT<sub>1</sub> receptor hraje hlavní roli v působení ANG II. Jeho bloádou se očekává vyšší specifita účinnosti než je u ACEi za předpokladu podmínek zvýšených hladin ANG II v plazmě. ANG II má poměrně krátký poločas rozpadu a je rychle metabolizován. ARB jsou známé svými kardioprotektivními a vazodilatačními účinky a účinky na TK při léčbě renovaskulární hypertenze (Wong et al. 1990). Hlavním mechanismem působení ARB je tedy inhibice vazokonstrikčního účinku AT<sub>1</sub> ANG II. Jako příklady bych zmínila candesartan, losartan, irbesartan, eprosartan, telmisartan nebo valsartan. ARB se u pacientů často kombinují s diuretiky či Ca<sup>2+</sup> blokátory.

ARB inhibují působení AT<sub>1</sub> negativní zpětnou vazbu, což vede ke zvýšené sekreci reninu, tím pádem ke zvýšení ANG I a ANGII, který je schopen vazby na AT<sub>2</sub> receptor, což by mohlo, vzhledem k antagonistickému působení AT<sub>2</sub> receptoru, přispívat k účinkům ARB (Carey 2003).

Některé typy ARB (například losartan či telmisartan) interagují ve vyšších koncentracích s draslíkovými kanály či ovlivňují účinky tromboxanu A2 jeho inhibicí (Monton et al. 2000). Účinky ARB byly testovány na různých zvířecích modelech, jako

například spontánně hypertenzní potkani nebo TGR. Podáním telmisartanu došlo k normalizaci TK u TGR (Böhm et al 1995).

ARB zvyšují citlivost baroreceptorů při regulaci TK (Kumagai et al. 1993), dále tlumí uvolňování vazopresinu z hypofýzy do krevního oběhu (Culman et al. 1999) a snižují riziko srdeční hypertrofie způsobené vzestupem TK (Dostal a Baker 1992). ARB se zároveň používají jako prevence srdeční hypertrofie po infarktu myokardu (Smits et al. 1992).

Na potkaních modelech s ledvinným selhání byl prokázán pokles albuminurie a proteinurie (Pollock et al. 1993). Dalším renoprotektivním účinkem je inhibice glomerulosklerózy (Noda et al. 1999), redukce intesticiální fibrózy a prevence infiltrace zánětlivými buňkami (Noda et al. 1997).

### **Přímé inhibitory reninu**

Jak bylo výše zmíněno, renin je syntetizovaný jako preprohormon a maturovaný je uložen v juxtaglomerulárních buňkách. Renin působí na angiotenzinogen, ze kterého vzniká ANG I.

Jako příklad bych uvedla Aliskiren, který má vysokou afinitu k reninu a který inhibuje. U pacientů snižuje TK, aniž by měl vliv na srdeční činnost (Wood et al. 2003). Dále udržuje hladinu  $s_{krea}$  a albuminu na normální úrovni. Snižuje množství ANG I a ANG II a působí preventivně proti infiltraci zánětlivými buňkami, snižuje riziko srdeční hypertrofie (Pilz et al. 2005).

### **Duální blokáda renin-angiotenzinového systému**

Protože ACEi nejsou schopné kompletně zablokovat přeměnu na ANG II, je v některých případech mnohem účinnější je kombinovat s ARB. ARB stimulují kinogénazu a produkci intracelulárního bradykininu a ACEi inhibují jeho degradaci. Tím dochází k aktivaci kaskády bradykinin – NO – cGMP a k výsledné vazodilataci, tlakové natriuríze, cytoprotekci a zmírnění glomerulosklerózy (Azizi et al. 1995). Některé studie ukazují, že duální léčbou je dosaženo výraznějšího poklesu TK a proteinurie než s maximálními dávkami monoterapií (Laverman et al. 2002). Novější studie však upozorňují na riziko hypotenze, hyperkalémie a zhoršení funkce ledvin (Desai et al. 2007). A však stále je tato léčba používána jak v klinice, tak v experimentálním výzkumu, kde se využívá benefitu zablokování osy RAS na více úrovních.

## **Blokátory endotelinového systému**

Jak již bylo zmíněno, ET<sub>A</sub> receptor ET-1 je velmi silný vazokonstriktor, který má mitogenní a prozánětlivé účinky. Blokátory endotelinových receptorů jsou využívány při léčbě plicní hypertenze (Hoeper et al. 2005) a dělíme je na selektivní a neselektivní.

Různé práce poukazují možný aditivní účinek blokátorů ET<sub>A</sub> receptoru a dávají tak naději ve zlepšení léčby a zpomalení progresu CKD. Práce ukazují pokles proteinurie a glomerulosklerózy (Dhaun et al. 2012; Gagliardini et al. 2009).

Existuje množství studií se selektivními blokátory či kombinací blokady ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>, které poukazují pokles TK, proteinurie a snížení tuhosti tepen. Je však otázkou, zda je to účinek blokace ES nebo RAS blokady, která byla v těchto studiích zároveň podávána (Dhaun et al. 2007; Dhaun et al. 2009; Wenzel et al. 2009).

Jiné studie naopak žádné aditivní účinky nedokazují (Bakris et al. 2010), některé studie byly dokonce pozastaveny z důvodu zvýšeného výskytu srdečních příhod (Mann et al. 2010). Pravděpodobným důvodem výskytu srdečních příhod byla retence tekutin a sodíku způsobená neselektivitou vybraného blokátoru (pro již zmíněnou studii), který příliš zablokoval tubulární ET<sub>B</sub> receptor (Ritz a Wenzel 2011). Z tohoto důvodu je poukázáno na důležitost selektivity použitého antagonisty, jako je například atrasentan (Motte et al. 2006). I další studie poukazují na problém zvyšování OECT (Mann et al. 2010; Zeeuw et al. 2014). Ani v naší studii nebyl prokázán aditivní účinek přidáním ET<sub>A</sub> blokátoru Atrasentanu k duální RAS blokádě (Sedláková et al. 2017).

## **Další možnosti léčby**

### **Blokátory kalciových kanálů**

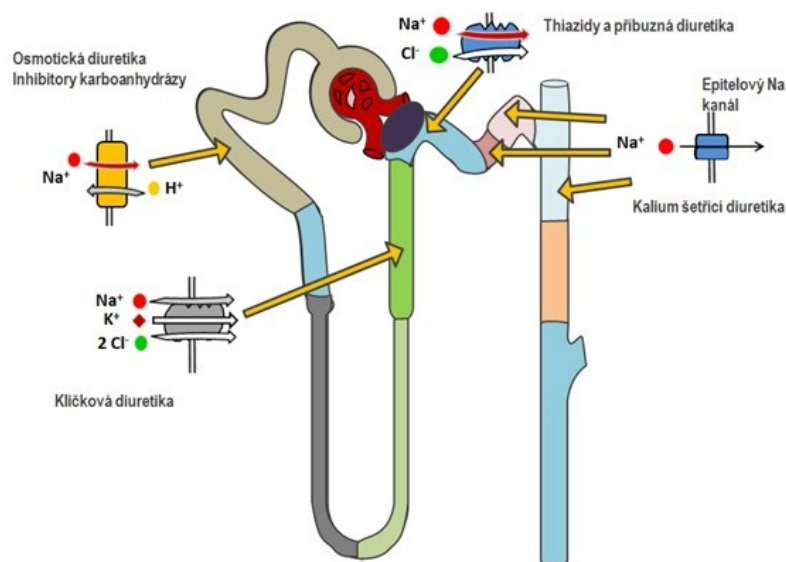
Hlavním mechanismem těchto léků je inhibice vstupu vápenatých iontů do myocytů a do buněk hladkých svalů cév. Dle místa účinku působí buď jako vazodilatátory nebo zpomalují kontraktilitu srdce. Dělí do několika skupin, dle účinků a vhodnosti léčby hypertenze (Dahlof et al. 1991; Šipula 2003).

Při léčbě hypertenze se využívá skupina blokátorů působících na dihydropyridinové kanály. Tyto blokátory nemění reninovou aktivitu a způsobují vazodilataci aferentní arterioly, tím snižují schopnost autoregulace ledvin (Griffin et al. 1999) a proto se využívají v kombinaci s ACEi, které tento negativní účinek ruší (Herlitz et al. 2001), například Amlodipin. Na rozdíl od nich, blokátory nehydropyridinového typu mají vliv na autoregulaci ledvin jen minimální (Hayashi et al. 2003) a lépe snižují proteinurii (Bakris et al. 2004).

## Diuretika

Diuretika patří mezi základní skupinu léčiv využívající se při léčbě hypertenze a jejich hlavním účinkem je reverzibilní inhibice transportních procesů v tubulech. Dělíme je do několika skupin: na diuretika kličková, thiazidová, osmotická a kalium šetřící. Účinkem jejich působení je pokles TK a plazmatického objemu (Gifford et al. 1961). Jako příklady diuretik bych zmínila indapamid, amilorid, spironolakton či furosemid.

Thiazidová diuretika způsobují v horní části distálního tubulu blokádu transportu NaCl a mezi jejich hlavní benefity patří dlouhodobé působení (Puschett 2000). Kličková diuretika blokují Na/Cl/K transportér a působí rychle, silně a krátkodobě a proto mají využití spíše v akutních případech (Ellison 1994). Kalium šetřící diuretika mají nízkou účinnost a rychlý nástup účinku. Jejich působením dochází k inhibici zpětné resorpce sodíku a k poklesu



Obrázek 11 Diuretika (převzato z Obr <http://wp.interna-cz.eu/diuretika-terapie-praxi>)  
Působení diuretik – na distální tubulus působí kalium šetřící a thiazidová diuretika, na proximální tubulus působí inhibitory karboanhydrázy a osmotická diuretika, v Henleově kličce působí kličková diuretika, která tam inhibují transportér pro ionty chloru, draslíku a sodíku.

sekrece draslíku a využívají se ve většině případů s thiazidovými diuretiky (Kau 1978).

Mezi diuretika dále patří antagonisté aldosteronu, které nemají vliv na syntézu aldosteronu, ale na jeho účinky a tudíž inhibují resorpce sodíku. (Ochs et al. 1978).

## Inhibitory aldosteronu

Inhibitory aldosteronu patří mezi slabá diuretika, konkrétně kalium šetřící. K inhibici dochází vazbou na aldosteronové mineralokortikoidní receptory, od toho jiný název blokátory

mineralokortikoidních receptorů (MRB), což vede nejen ke snížení TK, ale i funkčních a morfologických parametrů, zejména levé srdeční komory, MRB podporují regresi hypertrofie a blokují nárůst myokardiální fibrózy. Dochází tak ke zpomalování progresu srdečního selhání. Podobný protektivní účinek byl zaznamenán i v ledvinách, což vyplývá z patofyziologických účinků aktivace mineralokortikoidních receptorů (viz kapitola o aldosteronu). U pacientů léčených ACEi nebo ARB bylo prokázáno, že se zvyšuje hladina aldosteronu, což je známé jako „aldosteronový únik“ (Staessen et al. 1981), proto se MRB používají v kombinaci s ACEi či ARB. Avšak využití je stále na úrovni výzkumu a v klinické praxi v léčbě CKD je minimální. Můžeme najít studie, které ukazují vliv MRB na TK, například studie Ouzan a spol. z roku 2002 (Ouzan et al. 2002) nebo pokles proteinurie (Greene et al. 1996). MRB našly své využití při léčbě hypertenze jak esenciální (Schrijver a Weinberger 1979), tak rezistentní (Ouzan et al. 2002; Nishizaka et al. 2003).

Prvním inhibitorem byl Spironolakton, který se začal používat od roku 1970. Byl vyvinut pro léčbu edémů, esenciální hypertenze, primárního hyperaldosteronismu a hypokalemie (Schrijver a Weinberger 1979).

### **β-blokátory**

β-blokátory se dlouhodobě úspěšně využívají při léčbě kardiovaskulárních onemocnění (Norwegian Multicenter Study Group 1981). K jejich benefitům patří zabránění emočně a svalovou prací způsobenému zvýšení TK a srdeční frekvence nebo nebezpečí rizika hypotenze (Dahlöf et al. 1991). Mezi možné mechanismy účinku β-blokátorů například patří: účinek na CNS, inhibice periferního sympatiku, potlačení uvolňování reninu, vzestup produkce natriuretických peptidů, pokles uvolňování noradrenalinu, stimulace tvorby vazodilatačních prostaglandinů, menší reakce na katecholaminy při fyzické a psychické zátěži (Horký 1996).

β-blokátory můžeme rozdělit na selektivní a neselektivní v závislosti na účinku na β<sub>1</sub> nebo β<sub>2</sub> receptor a podle přítomnosti vnitřní sympatomimetické aktivity. Jako příklad bych zmínila propranolol, sotalol, pindolol, cervediol či celiprolol (Vítovec et al. 2004).

### **Blokátory I<sub>1</sub> imidazolinových receptorů a blokátory α<sub>1</sub>–adrenergických receptorů**

V rozvoji hypertenze a případně i srdečního selhání hraje dysfunkce sympatiku klíčovou roli (Parati a Esler 2012) a proto látky, které působí centrálně na α<sub>2</sub> adrenergní receptory nebo na imidazolinové receptory, které najdeme v ledvinách a prodloužené míše,

mají antihypertenzní účinek. Jako příklady uvedu moxonidin či rilmenidin (Edwards et al. 2012).

$\alpha_1$  adrenergní receptory se nachází v cévní stěně. Jejich blokátory působí jako antagonisté účinků noradrenalinu. Mezi blokátory patří prazosin, terazosin či fentolamin. Oba typy blokátorů se nevyužívají samostatně, ale jako doplňující medikace (Štejfá a kol. 2007).

## Standartní postupy léčby hypertenze a chronického onemocnění ledvin

Farmakologických možností léčby je několik: monoterapie nebo kombinovaná terapie obvykle složená ze dvou či tří typů antihypertenziv. Je potvrzeno, že monoterapií lze dosáhnout požadovaného účinku přibližně jen u třetiny pacientů, mnohem častěji jsou proto využívány kombinační terapie (Mancia et al. 2007). Aktuálně jsou doporučovány kombinace ACEi a blokátory kalciových kanálů nebo ACEi a diuretikum. U pacientů s intolerancí na ACEi se kombinuje sartan s blokátory kalciových kanálů popřípadě s diuretikem. Kombinace ACEi se sartanem nebo  $\beta$ -blokátorem i přes minimální aditivní účinek na pokles TK je doporučována pro pacienty s ischemickou chorobou srdeční, arteriální hypertenzí nebo chronickým selháním srdce. Nefrologové využívají kombinaci ACEi a  $AT_1$  blokátoru u pacientů s CKD a výraznou proteinurií. V případě těžké hypertenze se u pacientů volí trojkombinace léčiv, a to ACEi + blokátor kalciových kanálů + diuretikum (v České republice fixně kombinace perindopril + indapamid + amlodipin). Tabulka č. 7 ukazuje doporučené kombinace léčiv pro pacienty s hypertenzí a jiným onemocněním ([www.sukl.cz](http://www.sukl.cz)).

**Tabulka č. 7 Doporučené kombinace léků (Diu – diuretika, BB – betablokátory, ACEi – inhibitory ACE, ARB – antagonisté  $AT_1$ , MRA – antagonisté minerolokortikoidních receptorů, BKK – blokátory kalciových kanálů) ([www.sukl.cz](http://www.sukl.cz)):**

Komorbidity arteriální hypertenze	Kombinace léků
Chronické srdeční selhání	Diu, BB, ACEi, ARB, MRA
Infarkt myokardu, ischemická choroba srdeční	BB, ACEi, MRA
Chronická obstrukční nemoc plic	ACEi, BKK
Diabetes mellitus	ACEi, ARB, BKK
CKD	ACEi, ARB, BKK
Stav po cévní příhodě	Diu, ACEi



## **Cíle diplomové práce**

Cílem mé práce bylo srovnat vliv blokády renin-angiotenzinového systému na regresí chronického selhání ledvin s kombinovanou bloádou renin-angiotenzinového systému a ET<sub>A</sub> receptoru.

Práce měla tři části:

- 1. Vliv kombinované léčby na přežívání**
- 2. Vliv kombinované léčby na změnu tlaku**
- 3. Vliv kombinované léčby na plazmatické hladiny ANG II, ANG 1-7, plazmatickou reninovou aktivitu, na tkáňové koncentrace ANG II a ET-1 v ledvině a expresi genů pro AT<sub>1</sub> a AT<sub>2</sub> receptor.**

# Experimentální část

## Modelový organismus

V tomto pokusu byli použiti samci normotenzního kmene Hannover Sprague-Dawley (HanSD) a hypertenzního Ren-2-transgenního (TGR) kmene.

### Ren-2-transgenní model hypertenze

Kmen potkanů byl vytvořený v roce 1990 (Mullins et al. 1990) a je využíván ve výzkumu hypertenze dodnes. Model hypertenze je monogenní, má vložený pouze jeden gen. Genetickým základem jsou normotenzní HanSD potkani, do kterých je zavedený myší reninový gen Ren-2 (Langheinrich et al. 1996).

U heterozygotních TGR se okolo pátého týdne věku začíná vyvíjet hypertenze s maximálními hodnotami okolo 200 mmHg, kterých dosahují přibližně v 10. týdnu a s přibývajícím věkem jim TK opět klesá (Kasper et al. 2005). U homozygotů dosahují hodnoty TK až 300 mmHg, z čehož vyplývá, že stupeň hypertenze je závislý na množství exprimovaného transgenu (Dvorak et al. 2004). K vysoké expresi Ren-2 genu dochází v thymu, nadledvinách, v mozku, plicích, ledvinách či močových cestách (Engler et al. 1998), s rozvojem hypertenze exprese v tkáních klesá kromě mozku a nadledvin (Zhao et al. 1993).

## Model 5/6 nefrektomie

Model 5/6 nefrektomie (NX) je model redukce renálního parenchymu, který patří mezi jeden z nejčastěji studovaných modelů progresivního selhání ledvin u zvířat a nejlépe je propracován u potkanů (Striker et al. 1995; Kitamura et al. 1998). Jako 5/6 NX můžeme označovat dva zcela odlišné modely, dle způsobu redukce parenchymu. Modely je důležité odlišovat pro další progresi selhání ledvin (Fleck et al. 2006). Pro naši studii byl použit ablační model 5/6 NX.

### Ligační model 5/6 nefrektomie

Toto je model uninefrektomie s následným podvazem větví renální arterie ledviny, která byla ponechána, s následkem ischemie a nekrózy pólů. Aplikací tohoto zákroku dochází k okamžitému rozvoji hypertenze a k progresi CKD. U zvířat lze naměřit vysoké koncentrace plazmatického i intarenálního reninu. Hypertenzi lze účinně zabránit podáním ACEi.

## **Ablací model 5/6 nefrektomie**

Tento model je spojen s odstraněním ledviny jedné celé a polů druhé, což odpovídá přibližně 50% váhy celé odstraněné ledviny. Ablací ledvin u normotenzních zvířat nevzniká okamžitě hypertenze a k úplnému selhání ledvin dochází přibližně po čtyřech měsících od zákroku. U hypertenzních zvířat je průběh selhávání mnohem progresivnější s vysokou mortalitou. Jako první známky změn v ledvinové tkáni dochází k hypertrofii glomerulů. TK u normotenzních zvířat může zůstat po celou dobu progresu stejný nebo jen mírně stoupat. Hladiny reninu v plazmě zůstávají nízké a účinnost ACEi je potencionována současnou restrikcí soli (Terzi et al. 1992).

## **Zdánlivá operace u kontrolních zvířat**

U normotenzních HanSD a kontrolních TGR potkanů byla provedena zdánlivá („sham“) operace v 6. týdnu věku. Obě skupiny byly anestetizovány stejnou anestézií jako skupiny s 5/6 NX, byla jim otevřena dutina břišní a provedena lehká manipulace s oběma ledvinami a následným sešitím rány.

## **Výběr léčby**

Pro naši studii jsme zvolili antihypertenzní léčbu založenou na duální blokádě RAS – ACEi a ARB, která vykazuje maximální antihypertenzní a velmi dobré renoprotektivní účinky u TGR (Kujal et al. 2010). Třetí účinnou komponentou, aldosteronem, jsme se nezabývali, neblokovali ho a ani neměřili jeho hladiny, proto dále používáme označení pouze RAS. Vzhledem k tomu, že předchozí studie ukazují zvýšenou aktivitu RAS a ES u modelu 5/6 NX (Vaněčková et al. 2012), tak jsme se rozhodli otestovat kombinaci inhibitorů RAS se selektivním antagonistou ET<sub>A</sub> receptoru.

## **Experimentální skupiny a průběh experimentu**

Samcům byla v šestém týdnu věku provedena sham-operace nebo 5/6 NX (v grafech jako týden -6). Po 6 týdnech regenerace byla zvířata rozdělena do 5 skupin a zahájena příslušná léčba v pitné vodě (v grafech jako týden 0). Skupiny byly shodné ve všech částech experimentu. Potkani s 5/6 NX byli rozděleni do tří skupin dle léčby: 5/6 NX + voda; 5/6 NX + RAS blokáda (trandolapril Gopten, 6mg/l vody; Abbot, Praha, Česká republika + losartan

Lozap, 100mg/l vody, Zentiva, Praha, Česká republika) a RAS blokáda + ET<sub>A</sub> blokáda (atrasentan 25mg/l vody; Abbot, Illinois, USA). Experimentální skupiny byly shodné pro všechny části experimentu.

Zvířata byla operována pod anestezií tiletamin + zolazepam (8 mg/kg; Virbac SA, Carros Cedex, France) a xylazin (4mg/kg; Spofa, Česká republika) aplikovanou intramuskulárně.

V první části pokusu byli potkani umístováni na 24 hodin do metabolických klecí za účelem sběru moče, ze které byl měřen albumin a kreatinin. Potkanům pak byla odebírána krev z ocasní žíly, ze které se měřila plazmatická koncentrace kreatininu. Z hodnot naměřených z odběrů po metabolických klecích byla vypočtena podle vzorečku clearance kreatininu ( $CL_{\text{krea}} [\mu\text{l}/\text{min}/100 \text{ g tělesné hmotnosti}] = V_{\text{moč}} \times K_{\text{rea}_{\text{moč}}} / [krea]_{\text{pl}} / 24 / 60 \times 100$ ). Na konci pokusu, po 50 týdnech byla zvířata usmrcena a byly zváženy ledviny a srdce. Z ledviny potkanů byl stanoven index glomerulosklerózy.

Skupiny:

- |   |                  |
|---|------------------|
| 1. HanSD + voda                               | iniciální n = 8  |
| 2. TGR + voda                                 | iniciální n = 12 |
| 3. TGR 5/6 NX + voda                          | iniciální n = 36 |
| 4. TGR 5/6 NX + RAS blokáda                   | iniciální n = 20 |
| 5. TGR 5/6 NX + RAS + ET <sub>A</sub> blokáda | iniciální n = 20 |

V druhé části pokusu byla zvířatům po 4 týdnech od 5/6 NX nebo sham-operace implantována telemetrická sonda (TA11PA-C40; Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) do abdominální části aorty. Po implantaci měla zvířata 10 dnů na regeneraci a 4 dny před zahájením léčby bylo zahájeno měření TK, který se snímal každou hodinu po dobu 20s. Na konci pokusu byla potkanům odebrána levá srdeční komora a změřena tibie pro určení stupně srdeční hypertrofie.

Skupiny:

- |   |                 |
|---|-----------------|
| 1. HanSD + voda                               | iniciální n = 7 |
| 2. TGR + voda                                 | iniciální n = 8 |
| 3. TGR 5/6 NX + voda                          | iniciální n = 8 |
| 4. TGR 5/6 NX + RAS blokáda                   | iniciální n = 7 |
| 5. TGR 5/6 NX + RAS + ET <sub>A</sub> blokáda | iniciální n = 7 |

Ve třetí části byla provedena po 2 týdnech léčby dekapitace s následným měřením plazmatické hladiny ANG II, ANG 1-7, plazmatické reninové aktivity, tkáňové koncentrace ANG II a ET-1 v ledvině a exprese genů pro AT<sub>1</sub> a AT<sub>2</sub> receptor.

Skupiny:

- |   |                  |
|---|------------------|
| 1. HanSD + voda                               | iniciální n = 10 |
| 2. TGR + voda                                 | iniciální n = 10 |
| 3. TGR 5/6 NX + voda                          | iniciální n = 10 |
| 4. TGR 5/6 NX + RAS blokáda                   | iniciální n = 10 |
| 5. TGR 5/6 NX + RAS + ET <sub>A</sub> blokáda | iniciální n = 10 |

## Podmínky chovu a manipulace se zvířaty

Studie byla provedena v souladu s pravidly stanovenými výborem pro péči o zvířata a schválena výborem Institutu klinické a experimentální medicíny, která je v souladu státními předpisy a předpisy EU. Všechna zvířata byla chována v centru experimentální medicíny, za standardních podmínek 12 hodin světlo – 12 hodin tma. Zvířata měla volný přístup k vodě a k dietě (0,45% NaCl, 19-21% bílkoviny; SEMED, Praha, Česká republika).

## Laboratorní metody

### Stanovení albuminu v moči

Princip metody:

ELISA (*=enzyme-linked immuno sorbent assay*) je imunologická analytická metoda, která je založená na specifické interakci antigenu a protilátky za přítomnosti enzymu, který je kovalentně vázaný buď na antigen, nebo na protilátky a způsobuje barevnou chemickou reakci substrátu. Substrát je pak stanoven spektrofotometricky.

Přístroje:

Spektrofotometr: ELISA reader EPOCH (BioTek)

Chemikálie a materiál:

ELISA Kit Rat Albumin (AssayPro)

Protilátka 1 – Biotinylated Rat Albumin Antibody (AssayPro)

Protilátka 2 – Streptavidin-Peroxidase Conjugate (AssayPro)

Chromogen – Chromogen substrate (AssayPro)

Stop solution – 0,5 M HCl (Merck)

#### Postup:

Ke stanovení hodnot albuminu v moči byl použit ELISA Kit Rat Albumin. Vzorky byly ředěny postupnou ředící řadou. Dle návodu z kitu byly namíchány pracovní roztoky: ředící roztok (MIX Dilluent), promývací roztok (Wash Buffer) a roztok výchozího standardu. Dále naředěný roztok standardu (dle návodu v kitu) byl použit ke kalibraci.

Do označené 96 jamkové destičky (která je součástí kitu) byly v dubletech napipetovány vzorky včetně kalibrace, vše po 50 µl. Obsah destičky byl inkubován po dobu jedné hodiny. Po promytí bylo do všech jamek přidáno 50 µl protilátky 1. Po 30 minutové inkubaci a promytí destičky bylo do všech jamek přidáno 50 µl protilátky 2. Po další 30 minutové inkubaci a po promytí destičky bylo přidáno 50 µl chromogenu. Účinek chromogenu byl po 7 minutách zastaven přidavkem 50 µl roztoku tzv. stop-solution. Destička byla následně změřena na ELISA readeru při vlnové délce 450 nm.

## **Stanovení kreatininu v moči a v plazmě**

### **Plazmatický kreatinin**

#### Princip metody

Principem metody je tzv. Jeffova metoda (Jeff's method), při které reaguje kreatinin s alkalickým roztokem kyseliny pikrové za vzniku 2,4,6-trinitrocyclohexadinu. Reakce je doprovázena žluto-červeným zbarvením a intenzita barvy je dána koncentrací kreatininu.

#### Přístroje:

Spektrofotometr: ELISA reader EPOCH (BioTek)

#### Chemikálie a materiál:

Deionizovaná voda

Creatinine 30 (PZ CORMAY S.A.)

Kyselina pikrová (PZ CORMAY S.A.)

96 jamková destička (NUNC™)

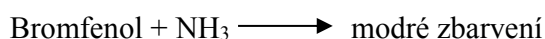
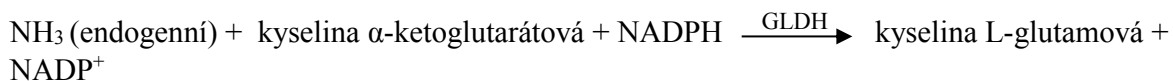
#### Postup:

Deionizovanou vodou naředěné vzorky byly napipetovány do 96 jamkové destičky, včetně kontrol a standardu, vše po 25 µl. Dále do každé jamky bylo napipetováno 200 µl Creatinine 30 a 50 µl kyseliny pikrové, čímž došlo k barevné reakci a destička byla změřena na ELISA readeru při vlnové délce 500 nm.

## Kreatinin v moči

### Princip metody:

Barevná reakce plazmy s DRI-CHEM SLIDE – CRE-P III a následné měření absorbance při 600 nm.



### Přístroje:

FujiFilm DRI-CHEM NX 500i (FUJIFILM Corporation)

### Chemikálie a materiál:

Měřicí slidy: DRI-CHEM SLIDE – CRE-P III (FUJIFILM Corporation)

Heparin (Zentiva)

### Postup:

Krev odebraná z ocasní žíly potkana byla sbírána do zkumavek s heparinem. Obsah zkumavek byl stočen na centrifuze. Po stočení byla odebrána plazma, která byla následně změřena pomocí automatického analyzátoru FujiFilm při vlnové délce 600 nm.

## Stanovení plazmatické reninové aktivity (PRA)

### Princip metody:

RIA (=radioimmunoassay) je imunologická metoda, která využívá antigenu označeného radioaktivním izotopem iodu ( $^{125}\text{I}$  v našem případě). V kompetitivní reakci soupeří neznačený a značený antigen a následně vznikají dva komplexy – s označeným a neoznačeným antigenem. Čím víc látky kterou stanovujeme je ve vzorku, tím méně komplexu s označeným antigenem vznikne a tím slabší bude výsledný signál, který je měřen na Gamma Counteru.

### Přístroje:

Gamma counter: MULTICRYSTAL COUNTER LB2104 (Bertold)

Třepačka: GmbM KS15 (Edmund Buhler)

Centrifuga: Sartotius (Sigma-Aldrich)

### Chemikálie a materiál:

Kit Angiotensin I (ZenTech)

Tracer  $^{125}\text{I}$  – Angiotensin (ZenTech)

Inhibitor – 1,10 – fenantrolin (Sigma-Aldrich), enalapril malonát (Sigma-Aldrich)

Pufr – fosfátový pufr ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  – Sigma-Aldrich)

#### Postup:

##### Fosfátový pufr:

Na fosfátový pufr o pH 7,4 byl na množství 900 ml namíchán z 600 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , 57 ml 0,2 M roztoku 1 (100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  a 2,78 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 243 ml 0,2 M roztoku 2 (250 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  + 7,1 g  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$ ).

Do všech zkumavek obsahujících 0,5 ml plazmy umístěných na ledu bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  inhibitoru a 50  $\mu\text{l}$  pufru. Z těchto zkumavek bylo následně odebráno 200  $\mu\text{l}$  do nových zkumavek, které byly inkubovány při 37°C po dobu 90 minut. Zbýlý obsah původních zkumavek byl ponechán na ledu (inkubace při 4°C). Po inkubaci byly takto upravené vzorky, včetně kalibrace a kontrol napipetovány po 50  $\mu\text{l}$  do označených zkumavek (jež jsou součástí kitu). Na závěr byl do všech zkumavek přidán tracer a obsah zkumavek byl ponechán třepat po dobu 90 minut. Poté byl odsán supernatant a vzorky byly změřeny na Gamma Counteru.

## **Stanovení angiotenzinu II v plazmě a v tkáni ledviny**

#### Princip metody:

RIA (=radioimmunoassay) je imunologická metoda, která využívá antigenu označeného radioaktivním izotopem iodu ( $^{125}\text{I}$  v našem případě). V kompetitivní reakci soupeří nezařazený a zařazený antigen a následně vznikají dva komplexy – s označeným a neoznačeným antigenem. Čím víc látky kterou stanovujeme je ve vzorku, tím méně komplexu s označeným antigenem vznikne a tím slabší bude výsledný signál, který je měřen na Gamma Counteru.

#### Přístroje:

Gamma counter: MULTICRYSTAL COUNTER LB2104 (Bertold)

Vakuová centrifuga: SpeedVac Savant SPD 101B (Biotech)

Homogenizátor: MM40i (RETSCH)

Centrifuga: Sartorius (Sigma-Aldrich)

Kolonky: VacElut SPS 24 (Agilent)

#### Chemikálie a materiál:

Kit Angiotensin II (IBL)

Inhibitory na krev – EDTA – 5 mM (AppliChem); pepstatin – 10  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich); 1,10 – fenantrolin (Sigma-Aldrich) - 1,25 mM; enalapril malonát (Sigma-Aldrich) – 20  $\mu\text{M}$

Antisérum – anti-angiotensin II (IBL)



Rozpoutědla – dH<sub>2</sub>O, metanol (Merck), hexan (Penta), chloroform (Penta)

Protilátka – double antibody solid phase (IBL)

Tracer – <sup>125</sup>I-angiotensin II (IBL)

Kolonky na čištění – Bond Elut – PH, 500MG, 3ML (Agilent)

Fosfátový pufr s 267 mg BSA/l (BSA od Bioveta)

#### Postup:

**Krev** byla odebrána do zkumavek s inhibitory. Stočením vzniklá plazma byla vysrážena v 4 ml etanolu (96%) a dalším stočením vzniklý supernatant byl odebrán a následně odpařen ve vakuové centrifuze.

**Tkáň** byla odebrána do zkumavek se 3 ml předchlazeného metanolu. Po stočení byl odebrán a následně odpařen vzniklý supernatant. Vzniklá peleta byla přečištěna extrakcí na pevné fázi. Poté byly do zkumavek (umístěných na ledu) přidány 4 ml 50 mM fosfátového pufru. Takto připravené vzorky byly extrahovány na kolonkách pomocí rozpouštědel v příslušném pořadí. Přečištěné vzorky rozpuštěné v metanolu byly znovu odpařeny na vakuové centrifuze.

Vzorky plazmy i tkáně (umístěné na ledu) byly rozpuštěny v 1 ml pufru. Poté bylo příslušné množství vzorků včetně kalibrace napipetováno do předem připravených skleněných zkumavek. Následně bylo do všech zkumavek přidáno 200 µl antiséra a obsah zkumavek byl inkubován po dobu 6 hodin. Následně bylo do všech zkumavek přidáno 200 µl traceru a jejich obsah byl inkubován po dobu 18-22 hodin při 4°C. Následně bylo do všech zkumavek přidáno 100 µl protilátky a jejich obsah byl inkubován po dobu 30-60 minut. Následně byl obsah zkumavek stočen a vzniklý supernatant byl odsán pomocí odsávačky. Peletky byly poté změřeny na Gamma Counteru.

## **Stanovení angiotenzinu 1-7 v tkáni ledviny**

#### Princip:

RIA (=radioimmunoassay) je imunologická metoda, která využívá antigenu označeného radioaktivním izotopem iodu (<sup>125</sup>I v našem případě). V kompetitivní reakci soupeří neznačený a značený antigen a následně vznikají dva komplexy – s označeným a neoznačeným antigenem. Čím víc látky, kterou stanovujeme, je ve vzorku, tím méně komplexu s označeným antigenem vznikne a tím slabší bude výsledný signál, který je měřen na Gamma Counteru.

#### Přístroje:

Gamma counter: MULTICRYSTAL COUNTER LB2104 (Bertold)

Vakuová centrifuga: SpeedVac Savant SPD 101B (Biotech)

Třepačka: GmbM KS15 (Edmund Buhler)

Homogenizátor: MM40i (Retsch)

Centrifuga: Sartotius (Sigma-Aldrich)

Kolonky: VacElut SPS 24 (Agilent)

#### Chemikálie a materiál:

Kolonky na čištění – Bond Elut – C18, 200MG, 3ML (Agilent)

Rozpouštědla – Metanol (Merck), dH<sub>2</sub>O, 4% kyselina octová (Penta), aceton (Penta), etanol (Penta)

Fosfátový pufr s 267 mg BSA/l (BSA od Bioveta)

Tracer – <sup>125</sup>I-angiotensin 1-7 (SoluPharm)

Pufr RI161 (SoluPharm)

#### Postup:

Tkáň byla odebrána do zkumavek se 3 ml předchlazeného metanolu. Obsah zkumavek byl stočen na centrifuze. Po stočení byl odebrán a následně odpařen vzniklý supernatant. Vzniklé peletky byly přečištěny extrakcí na pevné fázi. Poté byly do zkumavek (umístěných na ledu) přidány 4 ml 50 mM fosfátového pufru. Takto připravené vzorky byly extrahovány na kolonkách pomocí rozpouštědel v příslušném pořadí. Přečištěné vzorky rozpuštěné ve směsi etanolu, dH<sub>2</sub>O a 4% k. octové (v poměru 83:13:4) byly znovu odpařeny na vakuové centrifuze.

Vzorky byly rozpuštěny v 650 µl RI161 pufru o pH 7,2. Do označených zkumavek bylo napipetováno 300 µl od každého vzorku včetně kalibrace. Obsah zkumavek byl třepán na třepačce po dobu 90 minut při 400 otáčkách. Ke vzorkům bylo na závěr přidáno 100 µl traceru. Obsah zkumavek byl změřen po 24 hodinách inkubace na Gamma Counteru.

## **Stanovení endotelinu-1 v kůře ledvin**

#### Princip metody:

ELISA (*=enzyme-linked immuno sorbent assay*) je imunologická analytická metoda. Metoda je založená na specifické interakci antigenu a protilátky za přítomnosti enzymu, který je kovalentně vázaný buď na antigen, nebo na protilátky, a způsobuje barevnou chemickou reakci substrátu. Substrát je pak stanoven spektrofotometricky.

#### Přístroje:

Spektrofotometr: ELISA reader EPOCH (BioTek)

Centrifuga: Sartotius (Sigma-Aldrich)

Homogenizátor: MM40i (RETSCH)

Kolonky: VacElut SPS 24 (Agilent)

Chemikálie a materiál:

Kit endothlein-1 (IBL)

Protilátka 1 – HRP conjugated Anti-ET Rabbit IgG (IBL)

Kolonky na čištění SepPak Light C18 (Agilent)

Rozpouštědla – Metanol (Penta), dH<sub>2</sub>O, acetonitril (Fisher scientific), trifluoroctová kyselina (TFA) (Penta)

DMSO (Dimethylsulfoxid) (penta)

Homogenizační roztok - 1M kyselina octová (Penta) + 20mM HCl (Merch)

Chromogen – tetra metyl benzidin (IBL)

Stop solution – 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Penta)

Postup:

Tkáň (40 mg) byla odebrána a zhomogenizována ve 160 µl homogenizačního roztoku a poté zahřívána 10 minut při 100°C. Následně po ochlazení byly vzorky zcentrifugovány. Vzniklý supernatant byl přečištěn extrakcí na pevné fázi.

Dle návodu z kitu byly namíchány pracovní roztoky: ředící roztok (EIA buffer), promývací roztok (Wash Buffer), roztok výchozího standardu a protilátek. Roztok standardu byl pomocí ředícího roztoku dále naředěn podle návodu na příslušné koncentrace. Ke vzniklým peletám rozpuštěným v 0,1 ml 0,1% TFA v DMSO bylo přidáno 0,2 ml ředícího roztoku.

Do 96 jamkové destičky (která je součástí kitu) byly v dubletech napipetovány vzorky včetně kalibrace po 100 µl. Po inkubaci (přes noc, při 4°C) a po promytí bylo do každé jamky napipetováno 100 µl protilátky. Obsah destičky byl inkubován po dobu 30 minut, při 37°C. Po promytí bylo do všech jamek napipetováno 100 µl chromogenu. Obsah destičky byl inkubován po dobu 30 minut, při pokojové teplotě a ve tmě. Na závěr bylo přidáno 100 µl roztoku tzv.stop-solution, který reakci chromogenu ukončil. Destička byla změřena pomocí ELISA readeru při vlnové délce 450 nm.

## **Expres AT<sub>1</sub> a AT<sub>2</sub> receptoru ve tkáni ledviny**

Princip metody:

Měření exprese genů probíhá na základě metody Real Time PCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce, qPCR). Izolovaná mRNA je reverzní transkripcí převedena na cDNA.

Následně tato metoda vychází z klasické PCR, ke které je navíc přidán fluorescenční substrát SYBR Green, který se na DNA váže při tvorbě dvouřetězcového vlákna a emituje fluorescenční signál, který je zaznamenáván v reálném čase během každé amplifikace.

#### Výpočet:

Expres vzorků byla hodnocena metodou  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .  $C_t$  je cyklus, ve kterém hladina fluorescence dosáhne určité prahové hodnoty stanovené qPCR systémem. Tyto hodnoty byly použity k výpočtu relativní exprese cílového ( $AT_1$ ,  $AT_2$ ) a referenčního genu ( $\beta$ -aktin), který byl použit jako normalizátor, protože jeho hladina zůstává stabilní u všech skupin. Expres mRNA cílových genů byla kalibrována ke kontrolní skupině HanSD potkanů (kalibrátor). Relativní změna exprese ( $R$ , násobek změny) byla vyjádřena jako rozdíl exprese cílového genu ve vzorku a v kontrolní skupině podle vzorečku:  $R = 2^{-(\Delta C_t \text{ vzorek} - \Delta C_t \text{ kalibrátor})}$ , kde hodnoty  $\Delta C_t$  pro každý vzorek a kalibrátor byly určeny odečtením průměrných hodnot  $C_t$  pro  $\beta$ -aktin od průměrných  $C_t$  hodnot cílového genu.

#### Návrh primerů:

Návrh primerů byl designován v programu Primer3 software.

Primery pro  $AT_2$  receptor:

LEVÝ PRIMER	CCCTGGCAAGCATCTTATGT
PRAVÝ PRIMER	CCAGCAGACCACTGAGCATA

Primery pro  $AT_1$  receptor:

LEVÝ PRIMER	CCAAGATGACTGCCCCAAG
PRAVÝ PRIMER	ATCACCACCAAGCTGTTTCC

#### Přístroje:

Centrifuga: Sartorius (Sigma-Aldrich)

Termoblok (Grant)

Homogenizátor: MM40i (Retsch)

PCR box: Aura PCR (BioAir)

ViiA™ 7 Real-time PCR system (Applied Biosystems)

Spekrofotometr: DS 11 (DeNovix Inc)

Program pro design primerů - Primer3 software (verze 4.0.0)

#### Chemikálie a materiál:

RNAzol® RT (Molecular Research Center)

Chloroform (Penta)

Etanol (75%) (Penta)

RNAzy-free voda (SERVA – BioTech)

RNAzy away (Molecular research center – BioTech)

One Step SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit II (TAKARA BioTech))

96 jamková PCR destička (IAB Biotech)

Krycí fólie (IAB BioTech)

Postup:

#### **Izolace RNA:**

Tkáň byla dle potřeby homogenizována v 1 ml RNAzolu 15 – 30 minut a 10 minut inkubována při laboratorní teplotě. Do zkumavek bylo následně napipetováno 0,4 ml RNAzy free vody, 15 minut inkubováno a 15 minut centrifugováno (4°C, 12 000 G). 0,5 ml supernatantu bylo přepipetováno do nových zkumavek s 0,4 ml etanolu, inkubováno 10 min při laboratorní teplotě a znovu centrifugováno. Supernatant byl odsán a vzniklá peleta RNA promyta 1 ml etanolu a znovu stočena při 7500 G. Peleta byla sušena v termobloku 5-10 minut při 55 °C a následně rozpuštěna v 0,1 ml RNAzy free vody. Koncentrace celkové izolované RNA byla změřena na spektrofotometru a naředěna na 50 ng/μl.

#### **qPCR reakce:**

Dle návodu z kitu byl namíchaný jednokrokový reakční mix (kombinující Reverzní transkriptázu a DNA Polymerázu), qPCR pufr a byly přidány specifické primery. Do každé jamky destičky bylo napipetováno 18 μl reakčního mixu a 2 μl celkové RNA (100 ng RNA/reakci). RNA byla pipetována v tripletech, u negativní kontroly byly místo RNA pipetovány 2 μl RNAzy free vody. Destička byla přelepena krycí fólií a po stočení umístěna do RealTime PCR cycleru, kde byl vybrán příslušný program (40 cyklů; denaturace – 95°C, 5s; amplifikace - 60°C, 30s). Specifita primerů byla zhodnocena podle křivek tání.

## **Histologie a index glomerulosklerózy**

#### Princip metody:

Glomerulosklerózní index (GSI) je semikvantitativní metoda hodnotící poškození glomerulů. Stanovení GSI je založeno na posouzení řezů ledvin obarvených PAS (periodic acid - Schiff) reakcí, na základě kterého se zobrazuje poškození (zesílení) bazálních membrán v glomerulárních kapilárách.

#### Výpočet:

V každém vzorku bylo vyhodnoceno nejméně 100 glomerulů, hodnocena byla skleróza a hyalinóza (=zánik glomerulu s hyalinní přeměnou). Dle stupně poškození byly glomeruly zařazeny do jedné z pěti skupin: 0. st. bez poškození, 1. st. do 25%, 2. st. 25 – 50%, 3. st. 50 – 75%, 4. st. 75 – 100%. Hodnoty byly dosazeny do vzorce  $((1*n_1)+(2*n_2)+(3*n_3)+(4*n_4))/(n_0+n_1+n_2+n_3+n_4)$ , kdy  $n_x$  je počet glomerulů s daným stupněm poškození (Nakano et al. 2008).

#### Přístroje:

Tkáňový procesor Leica TP 1020 (Leica Biosystems)

Parafinová linka Medite (Bamed)

Mikrotom Leica RM 2255 (Leica Biosystems)

Mikroskop Nikon Eclipse (Nikon instruments)

#### Chemikálie a materiál:

Neutrální formalín pH 7,2 - 7,4 (Diapath)

Histoalkohol 99 - mix absolutních alkoholů (Diapath)

Isopropylalkohol p.a. (Penta)

Xylen směs izomerů čistý (Penta)

Histowax, parafín (Bamed)

Bawax, parafín (Bamed)

Gill's hematoxylin II (Diapath)

Eosin G o Y vodný roztok (Diapath)

Kyselina chlorovodíková (Penta)

Kyselina jodistá p.a. (Penta)

Schiffova reagensie podle Hotchkisse – Mc Manuse (Diapath)

Mayerův hematoxylin (Diapath)

Pertex, montovací médium pro světelnou mikroskopii (Histolab AB)

Destilovaná voda

#### Postup:

Odebrané transversální řezy ledvin byly fixovány v 10% formalínu po dobu 24 hodin. Následně byly zpracovány v tkáňovém procesoru, kde byly odvodněny vzestupnou řadou alkoholů, prosyceny xylenem a následně parafínem. Vzorky pak byly zality parafínem do bločku, na mikrotomu nakrájeny na řezy tenké 3  $\mu$ m a přeneseny na sklíčko.

Skříčka s řezy byla odparafinována v xylenu a zavodněna v sestupné řadě alkoholů. Řezy byly barveny hematoxylin – eozinem (HE) pro všeobecný přehled a PAS reakcí pro posouzení GSI. Při barvení HE byl pro barvení jader použit Gillsův hematoxylin, pak byly řezy diferencovány kyselým alkoholem a následně byla dobarvena cytoplazma eozinem. Při barvení PAS reakcí se řezy nejdříve oxidovaly kyselinou jodistou, poté se barvily Schiffovým činidlem a jádra byla dobarvena Mayerovým hematoxylinem. Po obarvení byly řezy odvodněny vzestupnou řadou alkoholů, projasněny xylenem a zamontovány do trvalého média.

## **Statistické zpracování výsledků**

Všechny hodnoty byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM (standard error of mean). Jako statistická analýza byl použit Student's t-test, Wilcoxon's test pro nepárová data, Student-Newman-Keuls test nebo jednocestná analýza (one-way ANOVA), pro přežívací křivku byl použit Mantel-Cox test a Gehan-Breslow-Wilcoxon test v programu Graph pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Hodnoty překračující 95 % hranici pravděpodobnosti ( $p < 0,05$ ) byly považovány za signifikantní.

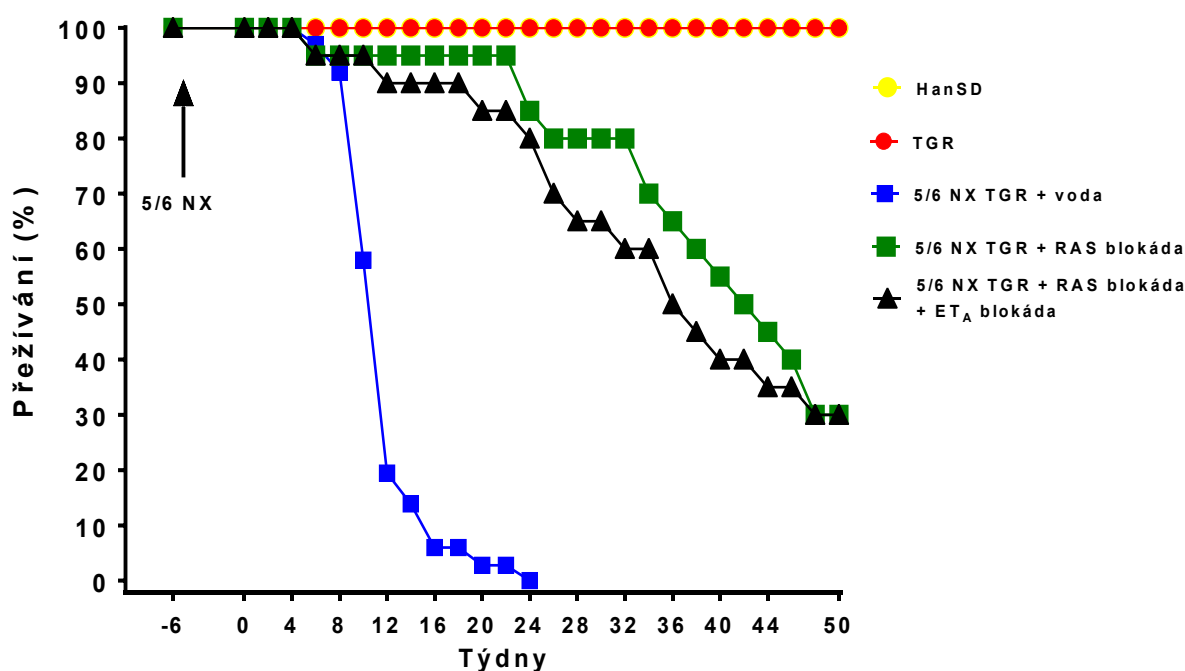
# Výsledky

## 1. série: Porovnání vlivu kombinované léčby inhibice

### RAS a selektivního ET<sub>A</sub> receptoru se samotnou duální RAS bloádou na přežívání a progresi CKD u 5/6 NX TGR

Graf č. 1 znázorňuje porovnání přežívání u normotenzních HanSD a TGR potkanů (100 % přežití) se skupinami nefrektomovaných TGR. U neléčených 5/6 NX TGR potkanů byla pozorována vysoká mortalita mezi 6. a 24. týdnem. Přestože oba typy léčby významně zvýšily přežití 5/6 NX TGR, přeživací křivka obou léčených skupin nebyla signifikantně odlišná se shodným 30 % přežitím na konci experimentu v 50. týdnu léčby.

*Graf č. 1 Přeživací křivka u jednotlivých experimentálních skupin po dobu 50 týdnů od zahájení léčebných postupů*

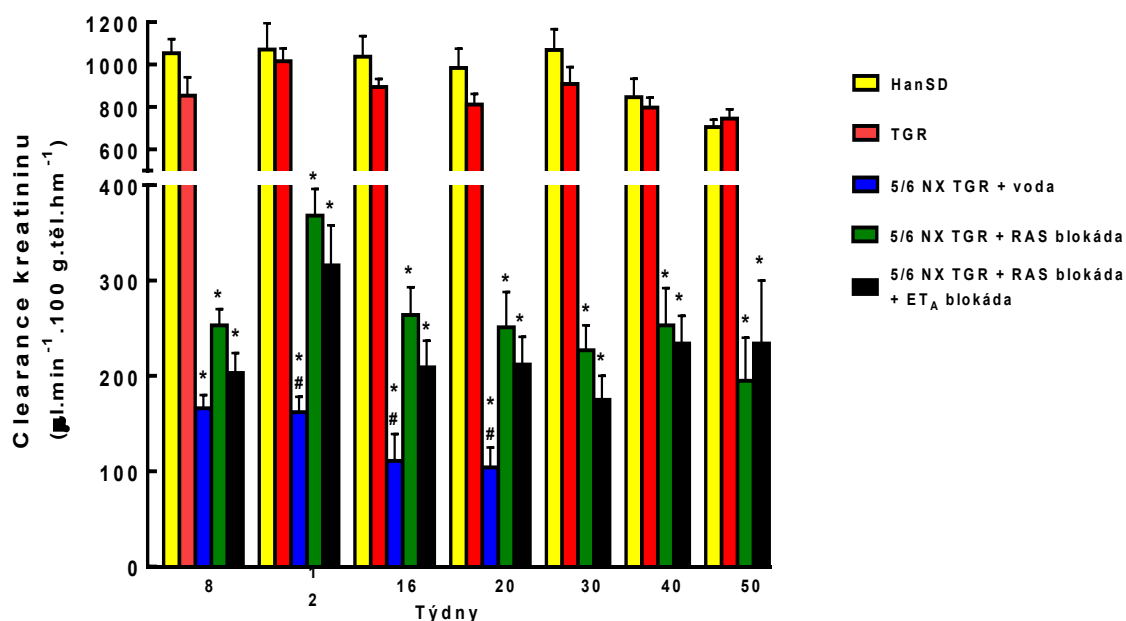


Výsledky clearance kreatininu (graf č. 2) se v průběhu experimentu ukazuje, že i přes rozvinutou hypertenzi TGR potkani měli zachovanou GFR na srovnatelné úrovni s normotenzními HanSD potkany. Nicméně dle předpokladů GFR byla výrazně snížena u 5/6



NX TGR. Oba typy léčby mírně zlepšily výši GFR, ale léčené skupiny opět nevykazovaly mezi sebou signifikantní rozdíly v průběhu experimentu.

**Graf č. 2 Clearance kreatininu v daných časových bodech v průběhu experimentu**

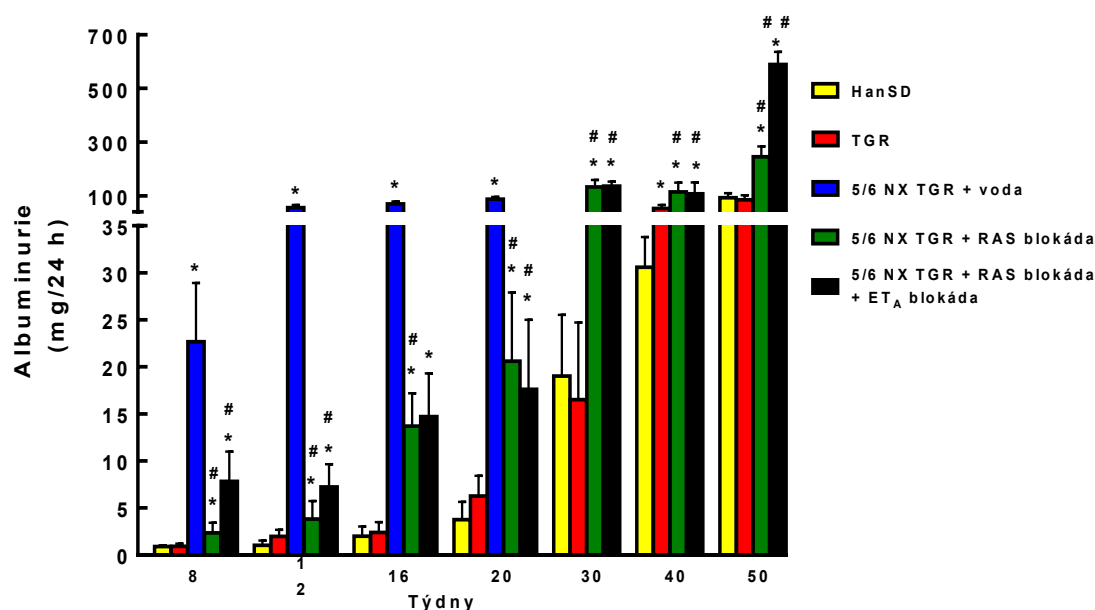


\* $p < 0,05$  v porovnání s potkany bez 5/6 NX

# $p < 0,05$  v porovnání s léčenými skupinami

Graf č. 3 s hodnotami albuminurie jako časného indikátoru renálního poškození nám ukazuje strmý vzestup u 5/6 NX TGR. Hodnoty u neléčené 5/6 NX TGR skupiny nedosáhly maximálních hodnot pro vysokou mortalitu zvířat, která pak nemohla být zahrnuta do grafu. Oba typy blokády zmírnily vzestup albuminurie až do 20. týdnu, po kterém jsme zaznamenali výraznější vzestup koncentrace albuminu v moči. Navíc na konci experimentu jsme také zaznamenali signifikantní zvýšení albuminurie u potkanů ve skupině s kombinovanou léčbou v porovnání se samotnou RAS blokádou ( $588 \pm 47$  vs.  $245 \pm 38$  mg/24 h,  $p < 0,05$ ).

**Graf č. 3 Albuminurie v daných časových bodech v průběhu experimentu**



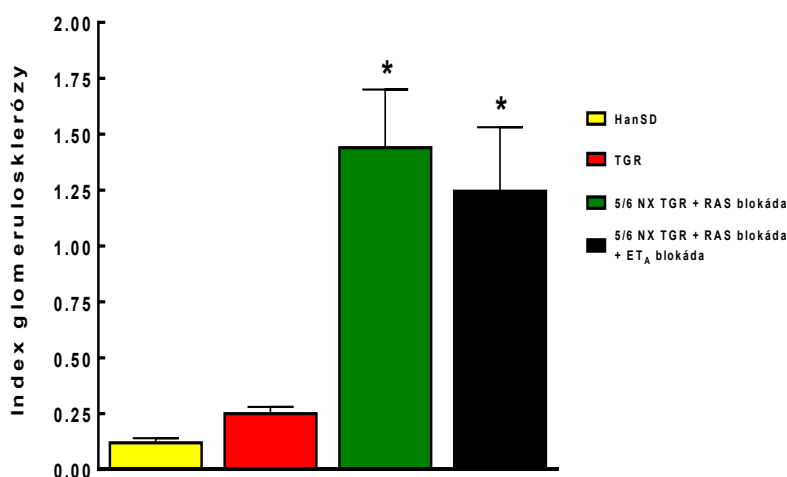
\* $p < 0,05$  v porovnání s normotenzními HanSD potkany

# $p < 0,05$  v porovnání s potkany bez 5/6 NX

##  $< 0,01$  v porovnání s RAS blokádou

Vzhledem ke 100 % mortalitě neléčených 5/6 NX TGR byl vyhodnocen index glomerulosklerózy pouze u ostatních skupin. Lze předpokládat, že i přes výrazné zvýšení počtu poškozených glomerulů u obou léčených skupin oba typy léčby vedly ke zmírnění progresu CKD. Nicméně významný rozdíl mezi léčenými skupinami nebyl zaznamenán (graf č. 4.)

**Obr. č. 4 Index glomerulosklerózy**

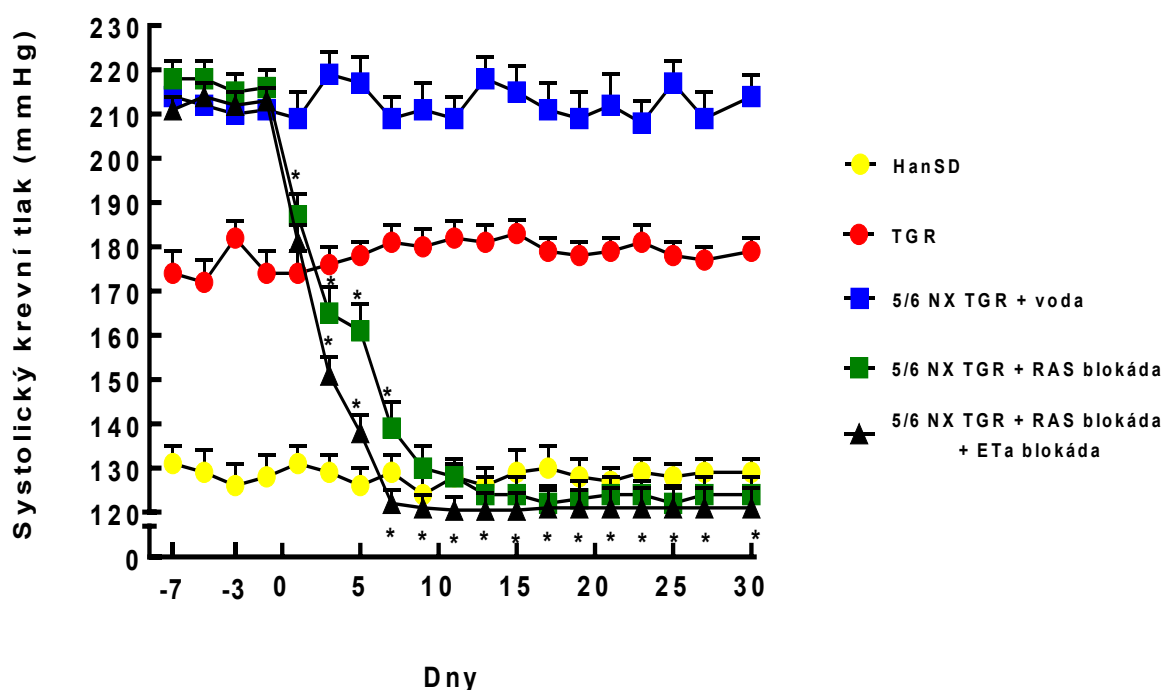


\* $p < 0,05$  v porovnání s neléčenými potkany

## 2. série: Vliv kombinované léčby na krevní tlak

Graf č. 5 ukazuje výši systolického krevního tlaku (STK) u jednotlivých experimentálních skupin před podáním léčby a v jejím průběhu po dobu 30 dnů. Zde byl patrný významný rozdíl v STK mezi normotenzními HanSD zvířaty, hypertenzními TGR a 5/6 NX TGR, u kterých STK dosahoval přes 210 mmHg. Důležitým poznatkem této studie byl poměrně rychlý pokles STK po zahájení léčby oběma typy blokády, a to až na úroveň normotenzních HanSD potkanů. Nicméně signifikantní rozdíly mezi léčebnými přístupy už nebyly patrné, právě z důvodů dosažení maximálního antihypertenzního účinku u tohoto modelu.

*Graf č. 5 Hodnoty systolického krevního tlaku po podání samotné RAS blokády nebo kombinované léčby u 5/6 NX TGR*

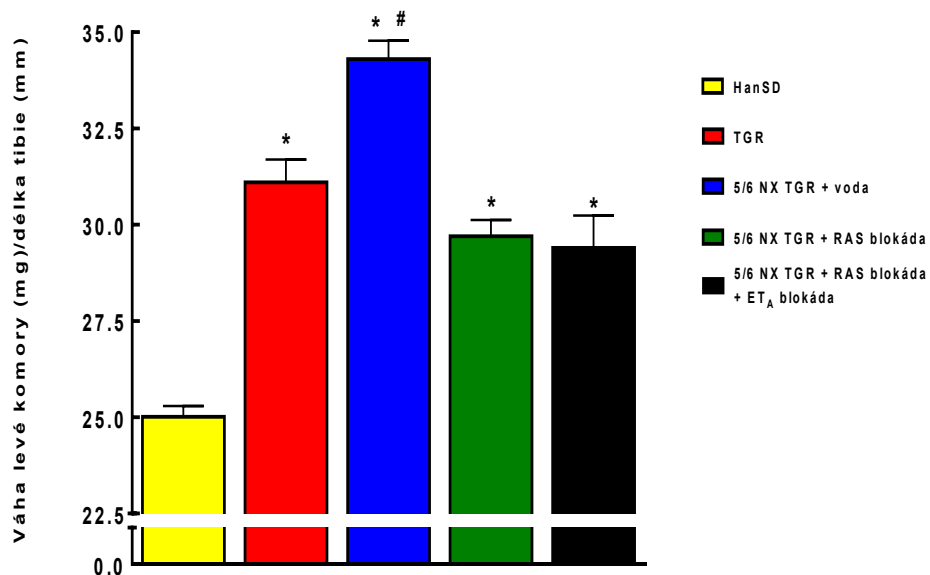


\* $p < 0,05$  v porovnání s výchozími hodnotami krevního tlaku (dny -7 – 0)

Po ukončení této série experimentů u telemetricky monitorovaných zvířat byl stanoven stupeň srdeční hypertrofie (graf č. 6), která velmi přesně reflektuje výši TK u jednotlivých skupin. Dle předpokladu TGR potkani vykazují hypertrofii v porovnání s normotenzními HanSD. U neléčených 5/6 NX TGR byl zjištěn nejvyšší stupeň srdeční hypertrofie. Oba typy

lčby zmírnily srdeční hypertrofii u 5/6 NX TGR velmi podobně, a to na úroveň hypertenzních TGR.

**Graf č. 6 Stupeň srdeční hypertrofie**



\* $p < 0,05$  v porovnání s normotenzními HanSD potkany

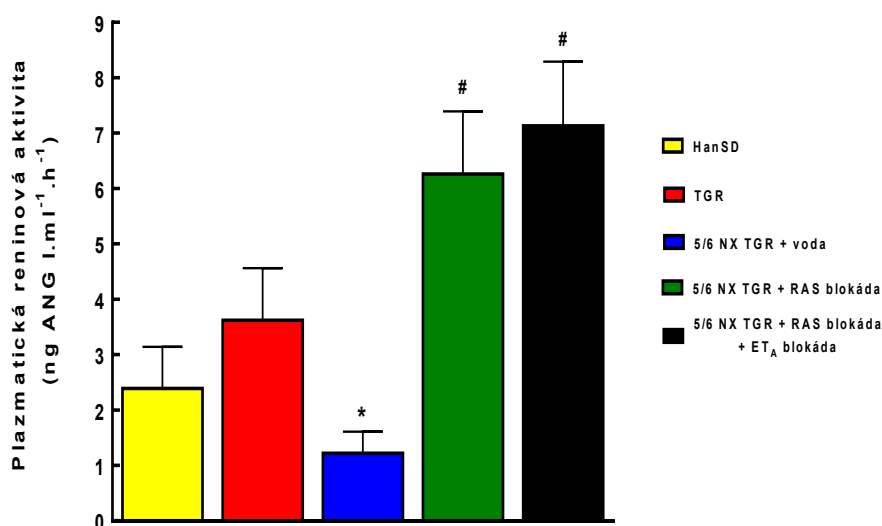
# $p < 0,05$  v porovnání se všemi ostatními skupinami

### 3. série: Vliv kombinované léčby na komponenty RAS a ES

Na následujících grafech jsou znázorněny hladiny jednotlivých měřených komponent obou vazoaktivních systémů v plazmě a ledvinách u jednotlivých experimentálních skupin po 2 týdnech výše popsaných léčebných postupů.

Měření PRA (graf č. 7) ukázalo významný útlum v reninové aktivitě u skupiny neléčených 5/6 NX TGR. Oba typy léčby naopak významně zvýšily PRA u 5/6 NX TGR. Tyto výsledky ukazují na zachování zpětné vazby aktivace reninu u nefrektomovaného modelu.

**Graf č. 7 Plazmatická reninová aktivita**

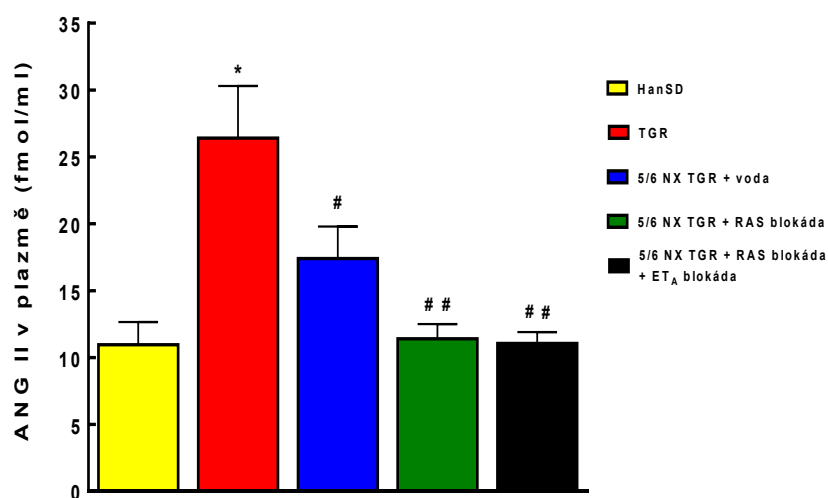


\* $p < 0,05$  v porovnání s potkany bez 5/6 NX

# $p < 0,05$  v porovnání s neléčenými potkany

Rozdíly v koncentracích ANG II v plazmě jsou znázorněny v graf č. 8, kde TGR vykazovali signifikantně zvýšené hladiny ANG II oproti normotenzním HanSD potkanům. U nefrektomovaných zvířat se koncentrace ANG II v plazmě snižovala. Důležitým poznatkem je, že oba léčebné přístupy výrazně snížily hladinu ANG II u 5/6 NX TGR, a to až na úroveň normotenzních zvířat, což potvrzuje účinnost inhibice tvorby ANG II u tohoto modelu.

**Graf č. 8 Plazmatický ANG II**



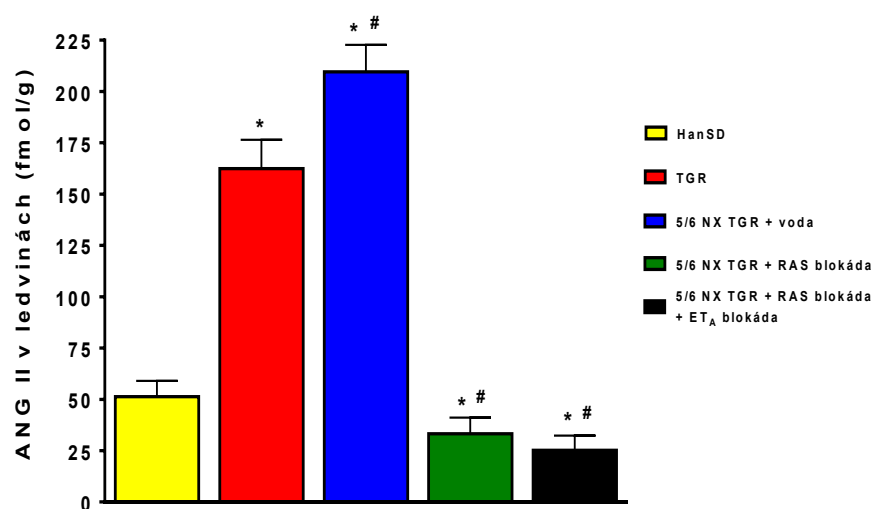
\* $p < 0,05$  v porovnání s normotenzními HanSD potkany

# $p < 0,05$  v porovnání s hypertenzními TGR potkany bez 5/6 NX

## $p < 0,01$  v porovnání s hypertenzními TGR potkany bez 5/6 NX

Dalším důležitým ukazatelem jsou koncentrace ANG II v ledvině (graf č. 9), kde TGR opět vykazovali výrazně zvýšené hladiny ANG II oproti normotenzním HanSD potkanům. Navíc u nefrektomovaných zvířat se koncentrace ANG II v ledvině dále signifikantně zvyšovaly. Opět oba léčebné přístupy významně snížily hladinu ANG II u 5/6 NX TGR, a to až pod úroveň normotenzních zvířat.

**Graf č. 9 ANG II v ledvině**

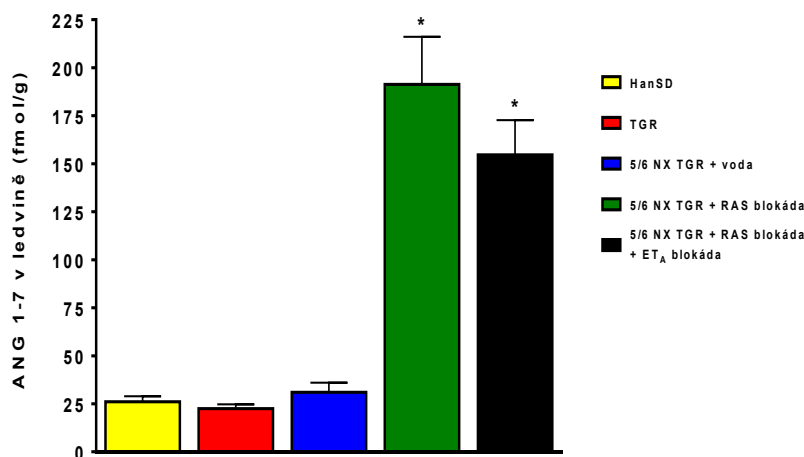


\* $p < 0,05$  v porovnání s normotenzními HanSD potkany

# $p < 0,05$  v porovnání s hypertenzními TGR potkany

Stanovení koncentrace ANG 1-7 v ledvině (graf č. 10) prokázalo, že oba léčebné přístupy významně zvýšily hladiny ANG 1-7 u 5/6 NX TGR, což naznačuje aktivaci vazodilatační osy RAS v průběhu duální RAS inhibice.

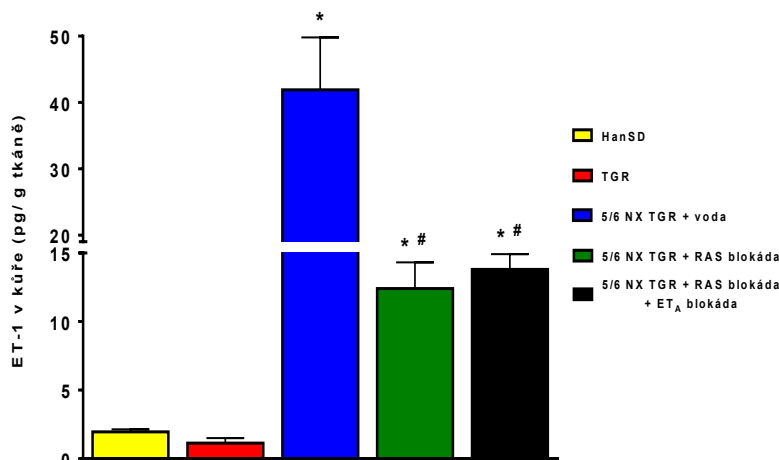
**Graf č. 10 ANG 1-7 v ledvině**



\* $p < 0,05$  v porovnání s neléčenými skupinami

Koncentrace ET-1 v ledvině kůže byl dalším důležitým ukazatelem pro ověření přímé interakce RAS a ES u modelu 5/6 NX TGR (graf č. 11). Zde je patrné, že nefrektomie vedla k velmi významnému zvýšení hladiny ET-1 v ledvinách, které byly signifikantně sníženy oběma léčebnými postupy u 5/6 NX TGR. Nicméně toto snížení nedosáhlo úrovně zvířat bez 5/6 NX.

**Graf č. 11 ET-1 v kůži ledviny**

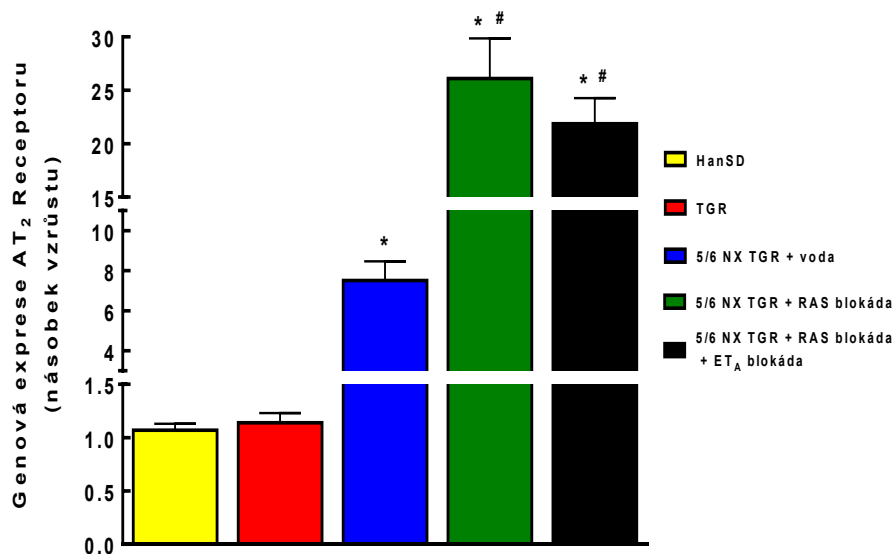


\* $p < 0,05$  v porovnání s potkany bez 5/6 NX

# $p < 0,05$  v porovnání s neléčenými skupinami

Stanovení genové exprese genů pro receptory ANG II ukázalo, že v ledvině nedochází ke změně v expresi AT<sub>1</sub> receptorů, nicméně bylo zjištěno zvýšení exprese AT<sub>2</sub> receptorů u 5/6 NX TGR (graf č. 12). Navíc oba léčebné přístupy ještě významně zvýšily expresi tohoto genu v ledvinách, což naznačuje možnost protektivních účinku zprostředkovaných přes tyto receptory v průběhu duální RAS inhibice.

**Graf č. 12 Genová exprese AT<sub>2</sub> receptoru v ledvině**



\*p < 0,05 v porovnání s potkany bez 5/6 NX

#p < 0,05 v porovnání s neléčenými skupinami



## Diskuze

Zcela zásadním zjištěním této studie bylo, že blokátor ET<sub>A</sub> receptoru přidaný k duální RAS blokádě nemá z dlouhodobého hlediska u hypertenzních potkanů po 5/6 NX s rozvinutou CKD žádný aditivní účinek. A to ať už z hlediska přežívání, antihypertenzního účinku, poškození ledviny nebo zmírnění srdeční hypertrofie. Tím výsledky potvrzují dosavadní poznatky (Kujal et al. 2010), že v pokročilém stádiu CKD organoprotektivní a zejména pak renoprotektivní účinky cílené inhibice RAS postupně klesají, zejména ve srovnání s velmi účinnou léčbou v časných fázích progresu CKD (Čertíková-Chábová et al. 2014), kde kombinovaná inhibice RAS a ES vykazuje výrazné renoprotektivní účinky i ve srovnání se samotnou duální RAS blokádou. Tyto poznatky tak přinášejí nový náhled na zcela zásadní důležitost včasného podání cílené terapie před rozvojem ireverzibilního poškození orgánů, zejména pak ledvin v průběhu progresu CKD. Dalším důležitým aspektem zůstává účinnost příslušné léčby v efektivní inhibici obou systémů (RAS i ES) přímo v ledvinách, čímž by pak mělo být dosaženo maximálního renoprotektivního účinku.

Ze současné i našich předchozích studií (Kujal et al. 2010, Čertíková-Chábová et al. 2014, Vaněčková et al. 2012) je zcela zřejmá úloha RAS v rozvoji hypertenze a CKD u modelu Ren 2 TGR, zejména pak po ablační 5/6 nefrektomii. Naše výsledky jasně ukazují na kritickou aktivaci intrarenálního RAS a současně ES u 5/6 NX TGR modelu, která bez cílené léčby vede k celkovému selhání ledvin a 100% úmrtnosti zvířat v průběhu 30 týdnů od provedení nefrektomie. Vedle výrazně zvýšené koncentrace ET-1 v ledvině (zhruba 20-ti násobný vzestup ve srovnání s hypertenzními TGR) byly potvrzeny u 5/6 NX TGR zvýšené exprese genů pro ET-1 a ECE-1 (Sedláková et al. 2017). Z takto zvýšené aktivity ES v ledvině lze předpokládat, že dochází k závažným funkčním i strukturálním poškozením ledvinové tkáně, kterou jsme prokázali výrazně sníženou clearance kreatininu, zvýšenou albuminurií a nárůstem glomerulosklerotických změn. Navíc tyto změny byly zvolenými cílenými léčebnými postupy zmírněny pouze částečně nebo jen přechodně, což prokazuje irreverzibilitu těchto procesů v ledvinách, ve kterých RAS a ES hrají zásadní patofyziologickou úlohu.

Tento poznatek potvrzuje i předchozí studie (Vaněčková et al. 2012), kdy samotná selektivní inhibice ET<sub>A</sub> receptorů vykazuje pouze částečné a přechodné protektivní účinky u tohoto modelu a nepotlačuje produkci ET-1. Proto je vždy nutné účinně blokovat RAS, zejména pak duální inhibicí jak ACE, tak AT<sub>1</sub> receptorů, která významně ovlivňuje aktivitu ES v ledvinách (Čertíková-Chábová et al. 2014, Sedláková et al. 2017), ale zcela ji

nepotlačuje. Proto kombinovaná léčba inhibující aktivitu obou systémů by měla z logiky věci přinést aditivní renoprotektivní účinky.

Jedním z možných vysvětlení proč jsme nezaznamenali v této naší studii žádné pozitivní účinky kombinované léčby, mimo nezvratných procesů poškození ledvinné tkáně, jsou důkazy o velmi úzké vazbě renoprotekce na výši TK (Kujal et al. 2010). Naše výsledky ukazují, že oba terapeutické přístupy dosáhly maximálního antihypertenzního účinku, a proto průkaznost aditivních účinků vedoucích k renoprotekci byl těžko zaznamenateľný zejména vzhledem k relativně široké variabilitě spojené s procedurou ablační nefrektomie.

Dalším faktorem by mohla být aktivace vazodilatační osy RAS právě cílenou kombinací inhibice ACE a AT<sub>1</sub> receptorů, kdy naše výsledky prokázaly nejen aktivaci ANG 1-7 a Mas receptorů, ale i AT<sub>2</sub> receptorů pro ANG II (Sedláková et al. 2017) s možnou aktivací dalších protektivních mechanismů. Bylo prokázáno, že ANG 1-7 vedle vazodilatace a přímého vlivu na renální funkce vykazuje antiproliferační účinky, snižuje hladiny prozánětlivých cytokinů a adhezi leukocytů nebo zmírňuje projevy oxidativního stresu. Aktivací AT<sub>2</sub> receptorů je zvyšována aktivita NO/cGMP systému. Současně lze předpokládat, že podáním ACEi je ovlivněn i KKS. Proto tyto protektivní systémy mohly svým účinkem rovněž částečně maskovat účinnost souběžné blokády ET<sub>A</sub> receptorů pro ET-1 s RAS inhibicí v našem experimentu.

## **Význam studie pro klinickou medicínu**

Tato studie zejména potvrzuje důležitost zahájení včasné a cílené terapie jak hypertenze, tak renálního selhávání a tak účelně minimalizovat progresi ireverzibilních změn v ledvinách za patofyziologických stavů nadměrné aktivace RAS a ES. Přestože duální inhibice RAS na dvou úrovních, na úrovni ACEi a inhibice AT<sub>1</sub> receptorů, vykazuje výrazný renoprotektivní účinek ve srovnání s monoterapií, není tento léčebný postup v současné době doporučován z důvodu možných negativních účinků u pacientů, zejména diabetiků, u kterých se může projevit hyperkalémie, hypotenze a pokles renálních funkcí. Nicméně tento postup lze alternativně doporučit zejména u mladších nediabetických pacientů s progredujícím CKD a hypertenzí za opakované kontroly dávkování vzhledem k výši TK a plazmatické hladiny kalia.

Další limitací v klinické medicíně zůstává současné testování selektivních ET<sub>A</sub> receptorových inhibitorů, které v kombinaci s RAS inhibitory vedly k nežádoucí retenci vody a anémii i přes příznivý účinek zmírňující proteinurii u pacientů s CKD. I přes limitace těchto

léčebných postupů se pokračuje jak v experimentálních, tak klinických studiích, které dopomohou pochopení patofyziologických mechanismů, ve kterých RAS a ES významně ovlivňují rozvoj hypertenze a progresi CKD ve snaze nalézt optimální léčebný postup pro široké spektrum pacientů, kterým zajistí dobrou kontrolu TK, zpomalí nebo dokonce zvrátí orgánové poškození za minimálního projevu negativních účinků.

## **Závěr**

Naše studie prokázala, že kombinovaný léčebný postup inhibující RAS a selektivně ET<sub>A</sub> receptor pro ET-1 vykazuje stejné organoprotektivní účinky jako samotná duální blokáda RAS ve všech sledovaných parametrech u experimentálního modelu rozvinuté CKD i přesto, že byla prokázána významná patofyziologická úloha RAS a ES v progresi CKD u použitého modelu 5/6 NX TGR.

# Použitá literatura

## Reference

- Abassi ZA, Tate JE, Golomb E, Keiser HR.** 1992. Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension* 20:89-95
- Abbas A, Gorelik G, Carbin LA, Scicli AG.** 1997. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. *Hypertension* 30:217-21
- Alhenc-Gelas F, Marchetti J, Allegrini J, Corvol P, Menard J.** 1981. Measurement of urinary kallikrein activity. Species differences in kinin production. *Biochim Biophys Acta* 677:477-88
- Aliberti J, Viola JP, Vieira-de-Abreu A, Bozza PT, Sher A, Scharfstein J.** 2003. Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol* 170:5349-53
- Anggrahini DW, Emoto N, Nakayama K, Widyanoro B, Adiarto S, et al.** 2009. Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation. *Cardiovasc Res* 82:143-51
- Arima S, Kohagura K, Xu HL, Sugawara A, Abe T, et al.** 2003. Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation. *J Am Soc Nephrol* 14:2255-63
- Attinà T, Camidge R, Newby DE, Webb DJ.** 2005. Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart* 91:825-31
- Azizi M, Chatellier G, Guyene TT, Murieta-Geoffroy D, Ménard J.** 1995. Additive effects of combined angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II antagonism on blood pressure and renin release in sodium-depleted normotensives. *Circulation* 92:825-34
- Bakris GL, Lindholm LH, Black HR, Krum H, Linas S, et al.** 2010. Divergent results using clinic and ambulatory blood pressures: report of a darusentan-resistant hypertension trial. *Hypertension* 56:824-30
- Bakris GL, Weir MR, Secic M, Campbell B, Weis-McNulty A.** 2004. Differential effects of calcium antagonist subclasses on markers of nephropathy progression. *Kidney Int* 65:1991-2002
- Bakris GL, Weir MR, Shanifar S, Zhang Z, Douglas J, et al.** 2003. Effects of blood pressure level on progression of diabetic nephropathy: results from the RENAAL study. *Arch Intern Med* 163:1555-65
- Banes-Berceli AK, Ketsawatsomkron P, Ogbi S, Patel B, Pollock DM, Marrero MB.** 2007. Angiotensin II and endothelin-1 augment the vascular complications of diabetes via JAK2 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H1291-9
- Beara-Lasić L, Knotek M, Cejvan K, Jakić O, Lasić Z, et al.** 1997. The effect of big endothelin-1 in the proximal tubule of the rat kidney. *Br J Pharmacol* 120:625-30
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K.** 1992. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44:1-80
- Blantz RC, Gabbai F, Gushwa LC, Wilson CB.** 1987. The influence of concomitant experimental hypertension and glomerulonephritis. *Kidney Int* 32:652-63
- Böhm M, Lee M, Kreutz R, Kim S, Schinke M, et al.** 1995. Angiotensin II receptor blockade in TGR(mREN2)27: effects of renin-angiotensin-system gene expression and cardiovascular functions. *J Hypertens* 13:891-9
- Boyd R, Rätsep MT, Ding LL, Wang HD.** 2011. ETA and ETB receptors are expressed in vascular adventitial fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H2271-8
- Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH.** 1982. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis

of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med* 307:652-9

**Briggs JP, Schnermann J.** 1986. Macula densa control of renin secretion and glomerular vascular tone: evidence for common cellular mechanisms. *Ren Physiol* 9:193-203

**Bright R.** 1836, Tabular view of the morbid appearances in 100 cases connected with albuminous urine. *Guy's Hospital Reports*, 1:380

**Browatzki M, Schmidt J, Kübler W, Kranzhöfer R.** 2000. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 95:98-105

**Brown L, Sernia C.** 1994. Angiotensin receptors in cardiovascular diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21:811-8

**Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF.** 2006. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 111:508-31

**Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, et al.** 2008. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation* 117:e510-26

**Campbell DJ.** 2003. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int J Biochem Cell Biol* 35:784-91

**Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM.** 1993. Bradykinin peptides in kidney, blood, and other tissues of the rat. *Hypertension* 21:155-65

**Carey RM, Siragy HM.** 2003. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 24:261-71

**Carmines PK, Navar LG.** 1989. Disparate effects of Ca channel blockade on afferent and efferent arteriolar responses to ANG II. *Am J Physiol* 256:F1015-20

**Carretero OA, Scicli AG.** 1978. The renal kallikrein-kinin system in human and in experimental hypertension. *Klin Wochenschr* 56 Suppl 1:113-25

**Čertíková Chábová V, Vernerová Z, Kujal P, Husková Z, Škaroupková P, et al.** 2014. Addition of ET(A) receptor blockade increases renoprotection provided by renin-angiotensin system blockade in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic rats. *Life Sci* 118:297-305

**Cervenka L, Símová M, Malý J, Heller J.** 2000. [Role of the kidney in long-term regulation of blood pressure and the development of hypertension]. *Cesk Fysiol* 49:116-33

**Chao J, Chao L, Swain CC, Tsai J, Margolius HS.** 1987. Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary. *Endocrinology* 120:475-82

**Chappell MC, Diz DI, Yunis C, Ferrario CM.** 1998. Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney. *Kidney Int Suppl* 68:S3-6

**Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, et al.** 2004. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1246-52

**Chun M, Lin HY, Henis YI, Lodish HF.** 1995. Endothelin-induced endocytosis of cell surface ETA receptors. Endothelin remains intact and bound to the ETA receptor. *J Biol Chem* 270:10855-60

**Cífková R, Skodová Z, Bruthans J, Holub J, Adámková V, et al.** 2010. Longitudinal trends in cardiovascular mortality and blood pressure levels, prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Czech population from 1985 to 2007/2008. *J Hypertens* 28:2196-203

- Coirini H, Magariños AM, De Nicola AF, Rainbow TC, McEwen BS.** 1985. Further studies of brain aldosterone binding sites employing new mineralocorticoid and glucocorticoid receptor markers in vitro. *Brain Res* 361:212-6
- Culman J, von Heyer C, Piepenburg B, Rascher W, Unger T.** 1999. Effects of systemic treatment with irbesartan and losartan on central responses to angiotensin II in conscious, normotensive rats. *Eur J Pharmacol* 367:255-65
- D'Orléans-Juste P, Plante M, Honoré JC, Carrier E, Labonté J.** 2003. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 81:503-10
- Dahlöf B, Lindholm LH, Hansson L, Scherstén B, Ekblom T, Wester PO.** 1991. Morbidity and mortality in the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension (STOP-Hypertension). *Lancet* 338:1281-5
- Defendini R, Zimmerman EA, Weare JA, Alhenc-Gelas F, Erdös EG.** 1983. Angiotensin-converting enzyme in epithelial and neuroepithelial cells. *Neuroendocrinology* 37:32-40
- Desai AS, Swedberg K, McMurray JJ, Granger CB, Yusuf S, et al.** 2007. Incidence and predictors of hyperkalemia in patients with heart failure: an analysis of the CHARM Program. *J Am Coll Cardiol* 50:1959-66
- Dhaun N, Ferro CJ, Davenport AP, Haynes WG, Goddard J, Webb DJ.** 2007. Haemodynamic and renal effects of endothelin receptor antagonism in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 22:3228-34
- Dhaun N, Macintyre IM, Melville V, Lilitkarntakul P, Johnston NR, et al.** 2009. Blood pressure-independent reduction in proteinuria and arterial stiffness after acute endothelin-a receptor antagonism in chronic kidney disease. *Hypertension* 54:113-9
- Dhaun N, Webb DJ, Kluth DC.** 2012. Endothelin-1 and the kidney--beyond BP. *Br J Pharmacol* 167:720-31
- Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME.** 2001. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 100:481-92
- Dostal DE, Baker KM.** 1992. Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens* 5:276-80
- Dostal DE, Baker KM.** 1999. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res* 85:643-50
- Dulce RA, Hurtado C, Ennis IL, Garcarena CD, Alvarez MC, et al.** 2006. Endothelin-1 induced hypertrophic effect in neonatal rat cardiomyocytes: involvement of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers. *J Mol Cell Cardiol* 41:807-15
- Dvorák P, Kramer HJ, Bäcker A, Malý J, Kopkan L, et al.** 2004. Blockade of endothelin receptors attenuates end-organ damage in homozygous hypertensive ren-2 transgenic rats. *Kidney Blood Press Res* 27:248-58
- Dzau VJ.** 1984. Vascular wall renin-angiotensin pathway in control of the circulation. A hypothesis. *Am J Med* 77:31-6
- Eddy AA.** 2005. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 12:353-65
- Eddy AA, Schnaper HW.** 1998. The nephrotic syndrome: from the simple to the complex. *Semin Nephrol* 18:304-16
- Edwards LP, Brown-Bryan TA, McLean L, Ernsberger P.** 2012. Pharmacological properties of the central antihypertensive agent, moxonidine. *Cardiovasc Ther* 30:199-208
- El Nahas M.** 2005. The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney Int* 68:2918-29
- Ellison DH.** 1994. Diuretic drugs and the treatment of edema: from clinic to bench and back again. *Am J Kidney Dis* 23:623-43
- Emoto N, Yanagisawa M.** 1995. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 270:15262-8

- Engler S, Paul M, Pinto YM.** 1998. The TGR(mRen2)27 transgenic rat model of hypertension. *Regul Pept* 77:3-8
- Erdős EG, Yang HY, Miwa I.** 1968. Kininases. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 349:928
- Erdős EG,** 1979, *Handbook of Experimental pharmacology*, Vol XXV Suppl: Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. Berlin: Springer-Verlag, pp. 427-487
- Farmer SG,** 1997, *The Kinin System*. San Diego, CA: Academic Press Inc; pp. 143-156
- Ferrario CM, Averill DB, Brosnihan KB, Chappell MC, Iskandar SS, et al.** 2002. Vasoepitidase inhibition and Ang-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int* 62:1349-57
- Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA.** 2005. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H2281-90
- Fiebeler A, Schmidt F, Müller DN, Park JK, Dechend R, et al.** 2001. Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension* 37:787-93
- Fine LG, Ong AC, Norman JT.** 1993. Mechanisms of tubulo-interstitial injury in progressive renal diseases. *Eur J Clin Invest* 23:259-65
- Fleck C, Appenroth D, Jonas P, Koch M, Kundt G, et al.** 2006. Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats--influence of sex, strain, and surgical procedure. *Exp Toxicol Pathol* 57:195-205
- Forbes MS, Thornhill BA, Chevalier RL.** 2011. Proximal tubular injury and rapid formation of atubular glomeruli in mice with unilateral ureteral obstruction: a new look at an old model. *Am J Physiol Renal Physiol* 301:F110-7
- Gagliardini E, Corna D, Zoja C, Sangalli F, Carrara F, et al.** 2009. Unlike each drug alone, lisinopril if combined with avosentan promotes regression of renal lesions in experimental diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* 297:F1448-56
- Garthwaite SM, McMahon EG.** 2004. The evolution of aldosterone antagonists. *Mol Cell Endocrinol* 217:27-31
- Garvin JL.** 1991. Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in rat proximal straight tubules. *J Am Soc Nephrol* 1:1146-52
- Gifford RW, Mattox VR, Orvis AL, Sones DA, Rosevear JW.** 1961. Effect of thiazide diuretics on plasma volume, body electrolytes, and excretion of aldosterone in hypertension. *Circulation* 24:1197-205
- Granger JP, Alexander BT.** 2000. Abnormal pressure-natriuresis in hypertension: role of nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 168:161-8
- Greene EL, Kren S, Hostetter TH.** 1996. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 98:1063-8
- Griffin KA, Picken MM, Bakris GL, Bidani AK.** 1999. Class differences in the effects of calcium channel blockers in the rat remnant kidney model. *Kidney Int* 55:1849-60
- Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT.** 1993. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 27:2130-4
- Guyton AC,** Textbook of medical physiology, W.B. Saunders Company, 1976
- Guyton AC.** 1989. Dominant role of the kidneys and accessory role of whole-body autoregulation in the pathogenesis of hypertension. *Am J Hypertens* 2:575-85
- Harding JW, Wright JW, Swanson GN, Hanesworth JM, Krebs LT.** 1994. AT<sub>4</sub> receptors: specificity and distribution. *Kidney Int* 46:1510-2
- Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, el-Dahr SS.** 1997. Immunohistochemical localization of ANG II AT<sub>1</sub> receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol* 273:F170-7

- Heller J, Schubert G, Havlíckova J, Thurau K.** 1993. The role of the kidney in the development of hypertension: a transplantation study in the Prague hypertensive rat. *Pflügers Arch* 425:208-12
- Herlitz H, Harris K, Risler T, Boner G, Bernheim J, et al.** 2001. The effects of an ACE inhibitor and a calcium antagonist on the progression of renal disease: the Nephros Study. *Nephrol Dial Transplant* 16:2158-65
- Hilgers KF, Veelken R, Müller DN, Kohler H, Hartner A, et al.** 2001. Renin uptake by the endothelium mediates vascular angiotensin formation. *Hypertension* 38:243-8
- Hoepfer MM, Markevych I, Spiekerkoetter E, Welte T, Niedermeyer J.** 2005. Goal-oriented treatment and combination therapy for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 26:858-63
- Hoffman A, Abassi ZA, Brodsky S, Ramadan R, Winaver J.** 2000. Mechanisms of big endothelin-1-induced diuresis and natriuresis : role of ET(B) receptors. *Hypertension* 35:732-9
- Horký K.** 1996. [Do beta-blockers have a role in the modern treatment of arterial hypertension?]. *Vnitr Lek* 42:420-5
- Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, et al.** 1992. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem* 267:18797-804
- Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, et al.** 1993. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 92:398-403
- Jacobsen S.** 1966. Separation of 2 different substrates for plasma kinin-forming enzymes. *Nature* 210:98-9
- Just A, Arendshorst WJ.** 2003. Dynamics and contribution of mechanisms mediating renal blood flow autoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R619-31
- Kasper SO, Carter CS, Ferrario CM, Ganten D, Ferder LF, et al.** 2005. Growth, metabolism, and blood pressure disturbances during aging in transgenic rats with altered brain renin-angiotensin systems. *Physiol Genomics* 23:311-7
- Kau ST.** 1978. Handling of triamterene by the isolated perfused rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 206:701-9
- Kedzierski RM, Yanagisawa M.** 2001. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:851-76
- Kinoshita A, Urata H, Bumpus FM, Husain A.** 1991. Multiple determinants for the high substrate specificity of an angiotensin II-forming chymase from the human heart. *J Biol Chem* 266:19192-7
- Kirchengast M, Münter K.** 1998. Endothelin and restenosis. *Cardiovasc Res* 39:550-5
- Kirkby NS, Hadoke PW, Bagnall AJ, Webb DJ.** 2008. The endothelin system as a therapeutic target in cardiovascular disease: great expectations or bleak house? *Br J Pharmacol* 153:1105-19
- Kitamura H, Shimizu A, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N.** 1998. Apoptosis in glomerular endothelial cells during the development of glomerulosclerosis in the remnant-kidney model. *Exp Nephrol* 6:328-36
- Kitamura K, Tanaka T, Kato J, Eto T, Tanaka K.** 1989. Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 161:348-52
- Klingbeil AU, Schneider M, Martus P, Messerli FH, Schmieder RE.** 2003. A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Med* 115:41-6



- Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM.** 2011. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev* 91:1-77
- Kriz W, LeHir M.** 2005. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int* 67:404-19
- Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Chabielska E, Buczek W.** 2002. Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system. *J Physiol Pharmacol* 53:533-40
- Kujal P, Chábová V, Vernerová Z, Walkowska A, Kompanowska-Jezińska E, et al.** 2010. Similar renoprotection after renin-angiotensin-dependent and -independent antihypertensive therapy in 5/6-nephrectomized Ren-2 transgenic rats: are there blood pressure-independent effects? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:1159-69
- Kumagai H, Averill DB, Khosla MC, Ferrario CM.** 1993. Role of nitric oxide and angiotensin II in the regulation of sympathetic nerve activity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 21:476-84
- Lakkis J, Lu WX, Weir MR.** 2003. RAAS escape: a real clinical entity that may be important in the progression of cardiovascular and renal disease. *Curr Hypertens Rep* 5:408-17
- Langheinrich M, Lee MA, Böhm M, Pinto YM, Ganten D, Paul M.** 1996. The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mREN2)27 in hypertension research. Characteristics and functional aspects. *Am J Hypertens* 9:506-12
- Lantelme P, Rohrwasser A, Gociman B, Hillas E, Cheng T, et al.** 2002. Effects of dietary sodium and genetic background on angiotensinogen and Renin in mouse. *Hypertension* 39:1007-14
- Laverman GD, Navis G, Henning RH, de Jong PE, de Zeeuw D.** 2002. Dual renin-angiotensin system blockade at optimal doses for proteinuria. *Kidney Int* 62:1020-5
- Lenfant C, Chobanian AV, Jones DW, Roccella EJ, Joint National Committee on the Prevention D, E.aluation, and Treatment of High Blood Pressure.** 2003. Seventh report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7): resetting the hypertension sails. *Hypertension* 41:1178-9
- Lewis GP.** 1964. Plasma kinins and inflammation. *Metabolism* 13:SUPPL:1256-63
- Lombès M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP.** 1992. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res* 71:503-10
- Long DA, Norman JT, Fine LG.** 2012. Restoring the renal microvasculature to treat chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 8:244-50
- López-Sendón J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, et al.** 2004. [Expert Consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease]. *Rev Esp Cardiol* 57:1213-32
- Lüscher TF, Barton M.** 2000. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 102:2434-40
- Maemura K, Kurihara H, Morita T, Oh-hashii Y, Yazaki Y.** 1992. Production of endothelin-1 in vascular endothelial cells is regulated by factors associated with vascular injury. *Gerontology* 38 Suppl 1:29-35
- Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, et al.** 2007. Reappraisal of European guidelines an hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *Journal of Hypertension*. 27: 2121-2158
- Mann JF, Green D, Jamerson K, Ruilope LM, Kuranoff SJ, et al.** 2010. Avosentan for overt diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 21:527-35
- Mann JF, Green D, Jamerson K, Ruilope LM, Kuranoff SJ, et al.** 2010. Avosentan for overt diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 21:527-35
- Masaki T.** 2000. The endothelin family: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 35:S3-5

- McCarthy R, Blizard DA, Chevalier RL et al.**, 1999 Handbook of Hypertension Development of the Hypertensive Phenotype: Basic and Clinical Studies, Vol 19: 287-304
- McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, et al.** 1991. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7724-8
- Mehta PK, Griendling KK.** 2007. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C82-97
- Mitchell KD, Navar LG.** 1988. Enhanced tubuloglomerular feedback during peritubular infusions of angiotensins I and II. *Am J Physiol* 255:F383-90
- Montón M, Jiménez A, Núñez A, López-Blaya A, Farré J, et al.** 2000. Comparative effects of angiotensin II AT-1-type receptor antagonists in vitro on human platelet activation. *J Cardiovasc Pharmacol* 35:906-13
- Morel-Maroger Striker L, Killen PD, Chi E, Striker GE.** 1984. The composition of glomerulosclerosis. I. Studies in focal sclerosis, crescentic glomerulonephritis, and membranoproliferative glomerulonephritis. *Lab Invest* 51:181-92
- Motte S, McEntee K, Naeije R.** 2006. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther* 110:386-414
- Mulatero P, Stowasser M, Loh KC, Fardella CE, Gordon RD, et al.** 2004. Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1045-50
- Mullins JJ, Peters J, Ganten D.** 1990. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344:541-4
- Munger KA, Sugiura M, Takahashi K, Inagami T, Badr KF.** 1991. A role for atrial natriuretic peptide in endothelin-induced natriuresis. *J Am Soc Nephrol* 1:1278-83
- Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H.** 2002. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension* 39:316-22
- Navar LG, Imig JD, Zou L, Wang CT.** 1997. Intrarenal production of angiotensin II. *Semin Nephrol* 17:412-22
- Neri Serneri GG, Boddi M, Coppo M, Chechi T, Zarone N, et al.** 1996. Evidence for the existence of a functional cardiac renin-angiotensin system in humans. *Circulation* 94:1886-93
- Nguyen G.** 2007. The (pro)renin receptor: pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16:129-33
- Nishiyama A, Yao L, Fan Y, Kyaw M, Kataoka N, et al.** 2005. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension* 45:710-6
- Noda M, Fukuda R, Matsuo T, Ohta M, Nagano H, et al.** 1997. Effects of candesartan cilexetil (TCV-116) and enalapril in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int Suppl* 63:S136-9
- Noda M, Matsuo T, Fukuda R, Ohta M, Nagano H, et al.** 1999. Effect of candesartan cilexetil (TCV-116) in rats with chronic renal failure. *Kidney Int* 56:898-909
- Nolly H, Carbini LA, Scicli G, Carretero OA, Scicli AG.** 1994. A local kallikrein-kinin system is present in rat hearts. *Hypertension* 23:919-23
- Nolly H, Saed G, Carretero OA, Scicli G, Scicli AG.** 1993. Adrenal kallikrein. *Hypertension* 21:911-5
- Norwegian Multicenter Study Group.** 1981. Timolol-induced reduction in mortality and reinfarction in patients surviving acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 304:801-7
- Ochs HR, Greenblatt DJ, Bodem G, Smith TW.** 1978. Spironolactone. *Am Heart J* 96:389-400

- Ody CE, Marinkovic DV, Hammon KJ, Stewart TA, Erdős EG.** 1978. Purification and properties of prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) from human kidney. *J Biol Chem* 253:5927-31
- Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, et al.** 1991. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 178:248-55
- Okunishi H, Miyazaki M, Okamura T, Toda N.** 1987. Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem Biophys Res Commun* 149:1186-92
- Omoro SA, Majid DS, El Dahr SS, Navar LG.** 2000. Roles of ANG II and bradykinin in the renal regional blood flow responses to ACE inhibition in sodium-depleted dogs. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F289-93
- Ouzan J, Pérault C, Lincoff AM, Carré E, Mertes M.** 2002. The role of spironolactone in the treatment of patients with refractory hypertension. *Am J Hypertens* 15:333-9
- Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM.** 1997. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT<sub>2</sub>) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* 30:1238-46
- Paasche JD, Attramadal T, Sandberg C, Johansen HK, Attramadal H.** 2001. Mechanisms of endothelin receptor subtype-specific targeting to distinct intracellular trafficking pathways. *J Biol Chem* 276:34041-50
- Padia SH, Kemp BA, Howell NL, Siragy HM, Fournie-Zaluski MC, et al.** 2007. Intrarenal aminopeptidase N inhibition augments natriuretic responses to angiotensin III in angiotensin type 1 receptor-blocked rats. *Hypertension* 49:625-30
- Parati G, Esler M.** 2012. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J* 33:1058-66
- Pendergrass KD, Averill DB, Ferrario CM, Diz DI, Chappell MC.** 2006. Differential expression of nuclear AT<sub>1</sub> receptors and angiotensin II within the kidney of the male congenic mRen2. Lewis rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F1497-506
- Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M, Fiebeler A, Dechend R, et al.** 2005. Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension* 46:569-76
- Piuhola J, Mäkinen M, Szokodi I, Ruskoaho H.** 2003. Dual role of endothelin-1 via ETA and ETB receptors in regulation of cardiac contractile function in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H112-8
- Pohl JE, Thurston H, Swales JD.** 1974. Hypertension with renal impairment: influence of intensive therapy. *Q J Med* 43:569-81
- Polónia J, Ferreira-de-Almeida J, Matias A, Campelo M, Branco A, et al.** 1993. Renin-angiotensin-aldosterone, sympathetic and endothelin systems in normal and hypertensive pregnancy: response to postural and volume load stimuli. *J Hypertens Suppl* 11:S242-3
- Puschett JB.** 2000. Diuretics and the therapy of hypertension. *Am J Med Sci* 319:1-9
- Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C.** 2001. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab* 12:157-62
- Regoli D.** 1983. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Adv Exp Med Biol* 156:569-84
- Ritz E, Wenzel RR.** 2011. Endothelin antagonist as add-on treatment for proteinuria in diabetic nephropathy: is there light at the end of the tunnel? *J Am Soc Nephrol* 22:593-5
- Romero JC, Reckelhoff JF.** 1999. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 34:943-9
- Rossi G, Albertin G, Belloni A, Zanin L, Biasolo MA, et al.** 1994. Gene expression, localization, and characterization of endothelin A and B receptors in the human adrenal cortex. *J Clin Invest* 94:1226-34

- Ruggenenti P, Perna A, Lesti M, Pisoni R, Mosconi L, et al.** 2000. Pretreatment blood pressure reliably predicts progression of chronic nephropathies. GISEN Group. *Kidney Int* 58:2093-101
- Sachetelli S, Liu Q, Zhang SL, Liu F, Hsieh TJ, et al.** 2006. RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney Int* 69:1016-23
- Saita Y, Koizumi T, Yazawa H, Morita T, Takenaka T, Honda K.** 1997. Endothelin receptors and their cellular signal transduction mechanism in human cultured prostatic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 121:687-94
- Sato A, Funder JW.** 1996. High glucose stimulates aldosterone-induced hypertrophy via type I mineralocorticoid receptors in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology* 137:4145-53
- Schiffrin EL.** 2001. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens* 14:83S-9S
- Schiffrin EL.** 2005. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 43:19-29
- Schnaper HW, Hubchak SC, Runyan CE, Browne JA, Finer G, et al.** 2010. A conceptual framework for the molecular pathogenesis of progressive kidney disease. *Pediatr Nephrol* 25:2223-30
- Schnermann J.** 2001. Cyclooxygenase-2 and macula densa control of renin secretion. *Nephrol Dial Transplant* 16:1735-8
- Schrijver G, Weinberger MH.** 1979. Hydrochlorothiazide and spironolactone in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 25:33-42
- Sealey JE, Atlas SA, Laragh JH.** 1978. Linking the kallikrein and renin systems via activation of inactive renin: new data and a hypothesis. *Am J Med* 65:994-1000
- Sedláková L, Čertíková Chábová V, Doleželová Š, Škaroupková P, Kopkan L, et al.** 2017. Renin-angiotensin system blockade alone or combined with ETA receptor blockade: effects on the course of chronic kidney disease in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 39:183-95
- Seyrantepe V, Hinek A, Peng J, Fedjaev M, Ernest S, et al.** 2008. Enzymatic activity of lysosomal carboxypeptidase (cathepsin) A is required for proper elastic fiber formation and inactivation of endothelin-1. *Circulation* 117:1973-81
- Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH.** 2004. Recombinant prolylcarboxypeptidase activates plasma prekallikrein. *Blood* 103:4554-61
- Sharma JN, Wirth KJ.** 1996. Inhibition of rats adjuvant arthritis by a bradykinin antagonist Hoe 140 and its influence on kallikreins. *Gen Pharmacol* 27:133-6
- Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, et al.** 2004. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 15:2707-19
- Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawachi H, Fujita T.** 2007. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension* 49:355-64
- Shimamatsu K, Onoyama K, Harada A, Kumagai H, Hirakata H, et al.** 1985. Effect of blood pressure on the progression rate of renal impairment in chronic glomerulonephritis. *J Clin Hypertens* 1:239-44
- Siragy HM, Jaffa AA, Margolius HS, Carey RM.** 1996. Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production. *Am J Physiol* 271:R1090-5
- Siragy HM, Xue C, Abadir P, Carey RM.** 2005. Angiotensin subtype-2 receptors inhibit renin biosynthesis and angiotensin II formation. *Hypertension* 45:133-7
- Skrobonja A, Kontosic I.** 1998. Arterial hypertension in correlation with age and body mass index in some occupational groups in the harbour of Rijeka, Croatia. *Ind Health* 36:312-7

- Smits JF, van Krimpen C, Schoemaker RG, Cleutjens JP, Daemen MJ.** 1992. Angiotensin II receptor blockade after myocardial infarction in rats: effects on hemodynamics, myocardial DNA synthesis, and interstitial collagen content. *J Cardiovasc Pharmacol* 20:772-8
- Souček M, Kára T a kol.** 2002 *Klinická patofyziologie hypertenze*, Praha: Grada: 649
- Souza Dos Santos RA, Passaglio KT, Pesquero JB, Bader M, Simões E Silva AC.** 2001. Interactions between angiotensin-(1-7), kinins, and angiotensin II in kidney and blood vessels. *Hypertension* 38:660-4
- Staessen J, Lijnen P, Fagard R, Verschueren LJ, Amery A.** 1981. Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin II suppression. *J Endocrinol* 91:457-65
- Steinback CD, Breskovic T, Frances M, Dujic Z, Shoemaker JK.** 2010. Ventilatory restraint of sympathetic activity during chemoreflex stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R1407-14
- Stock P, Liefeldt L, Paul M, Ganten D.** 1995. Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role. *Cardiology* 86 Suppl 1:2-8
- Striker GE, He CJ, Liu ZH, Yang DC, Zalups RK, et al.** 1995. Pathogenesis of nonimmune glomerulosclerosis: studies in animals and potential applications to humans. *Lab Invest* 73:596-605
- Šipula J** 2003, *Blokátory kalciových kanálů v léčbě hypertenze*
- Štejska M a kol.** 2007, *Kardiologie*, 3.přepřacované vydání
- Taal MW, Brenner BM.** 2000. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int* 57:1803-17
- Terada Y, Kobayashi T, Kuwana H, Tanaka H, Inoshita S, et al.** 2005. Aldosterone stimulates proliferation of mesangial cells by activating mitogen-activated protein kinase 1/2, cyclin D1, and cyclin A. *J Am Soc Nephrol* 16:2296-305
- Terzi F, Beauvils H, Laouari D, Burtin M, Kleinknecht C.** 1992. Renal effect of anti-hypertensive drugs depends on sodium diet in the excision remnant kidney model. *Kidney Int* 42:354-63
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ.** 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275:33238-43
- Toke A, Meyer TW.** 2001. Hemodynamic effects of angiotensin II in the kidney. *Contrib Nephrol*:34-46
- Tomita K, Nonoguchi H, Terada Y, Marumo F.** 1993. Effects of ET-1 on water and chloride transport in cortical collecting ducts of the rat. *Am J Physiol* 264:F690-6
- Tomiyama H, Scicli AG, Scicli GM, Carretero OA.** 1990. Renal effects of Fab fragments of kinin antibodies on deoxycorticosterone acetate-salt-treated rats. *Hypertension* 15:761-6
- Tornel J, Madrid MI, García-Salom M, Wirth KJ, Fenoy FJ.** 2000. Role of kinins in the control of renal papillary blood flow, pressure natriuresis, and arterial pressure. *Circ Res* 86:589-95
- Trivedi HS, Pang MM, Campbell A, Saab P.** 2002. Slowing the progression of chronic renal failure: economic benefits and patients' perspectives. *Am J Kidney Dis* 39:721-9
- Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, et al.** 1999. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest* 104:925-35
- Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, et al.** 1993. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest* 91:1269-81
- Urata H, Kinoshita A, Perez DM, Misono KS, Bumpus FM, et al.** 1991. Cloning of the gene and cDNA for human heart chymase. *J Biol Chem* 266:17173-9
- Vachek J, Zakiyanov O, Tesař V** 20012 *Chronické onemocnění ledvin*,  
www.internimedicina.cz

- Vaněčková I, Kujal P, Husková Z, Vaňourková Z, Vernerová Z, et al.** 2012. Effects of combined endothelin A receptor and renin-angiotensin system blockade on the course of end-organ damage in 5/6 nephrectomized Ren-2 hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res* 35:382-92
- Vítovec J, Špinar J a kol.** 2004, Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění. 2.vydání, Praha, Grada Publishing, 248
- Watts SW.** 2010. Endothelin receptors: what's new and what do we need to know? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:R254-60
- Wei CC, Tian B, Perry G, Meng QC, Chen YF, et al.** 2002. Differential ANG II generation in plasma and tissue of mice with decreased expression of the ACE gene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H2254-8
- Wenzel RR, Littke T, Kuranoff S, Jürgens C, Bruck H, et al.** 2009. Avosentan reduces albumin excretion in diabetics with macroalbuminuria. *J Am Soc Nephrol* 20:655-64
- Wong PC, Price WA, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, et al.** 1990. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 255:211-7
- Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, Grütter MG, Cohen NC, et al.** 2003. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 308:698-705
- www.klinickalaborator.cz**
- www.remedia.cz**
- www.sukl.cz**
- Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, et al.** 1998. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* 125:825-36
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T.** 1988. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *J Hypertens Suppl* 6:S188-91
- Yang HY, Erdös EG, Levin Y.** 1971. Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme). *J Pharmacol Exp Ther* 177:291-300
- Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, Murakawa K, Yasunari K, et al.** 1991. Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma. *Ann Intern Med* 114:213-5
- Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R.** 2008. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 19:2282-7
- Zhao Y, Bader M, Kreutz R, Fernandez-Alfonso M, Zimmermann F, et al.** 1993. Ontogenetic regulation of mouse Ren-2d renin gene in transgenic hypertensive rats, TGR(mREN2)27. *Am J Physiol* 265:E699-707

## Zdroje obrázků

- <http://img.medscape.com>
- <http://pfyziol.fup.upol.cz>
- <http://physrev.physiology.org>
- <http://todaysveterinarypractice.navc.com>
- <http://wp.interna-cz.eu/diureticka-terapie-praxi>
- <http://www.nature.com>

<http://www.sciencedirect.com>

<http://www.urology-textbook.com>

<https://www.jci.org>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3045541>

[www.endothelins.com](http://www.endothelins.com) – Can J Physiol Pharmacol 2008

[www.studentconsult.com](http://www.studentconsult.com)